

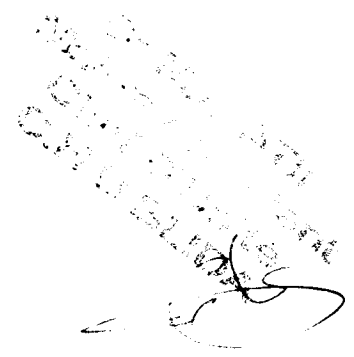
MA 35

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE.

UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA1.

FACULTE DE MEDECINE.

DEPARTEMENT DE PHARMACIE.



**LES ENTÉROBACTÉRIES RÉSISTANTES AUX  
CARBAPÉNÈMES ISOLÉES AU CHU BLIDA**

Mémoire de fin d'études

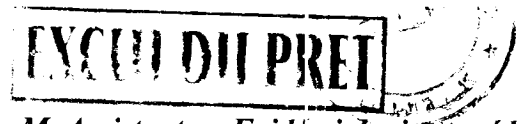
Présenté en vue de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie

Session : Juin 2015

Présenté par:

- ❖ AIT OUMGHAR Ouahiba
- ❖ BENBRIH Khadidja
- ❖ SALHI Manal

Devant le jury:



- ❖ Président: Dr. ATIF.M. L *M. Assistant en Epidémiologie et médecine préventive  
CHU Blida*
- ❖ Examinatrice: Dr. DAHMANI.F *M. Assistante en Microbiologie CHU Blida*
- ❖ Examinatrice : Dr. AZROU. S *M. Assistante en Microbiologie CHU Blida*
- ❖ Promotrice: Dr. BEROUAKEN.S *M. Assistante en Microbiologie CHU Blida*

## *Remerciement*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*Nous tenons à remercier sincèrement Docteur S. Serouaken, qui, en tant que Promotrice de mémoire, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nos vifs remerciement vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et contribué à l'élaboration de ce mémoire particulièrement le personnel et le corps service de microbiologie du CHU de Blida.*

*Ces remerciements vont au corps professoral et administratif du Département de Pharmacie de l'université de Blida, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.*

*On n'oublie pas nos famille et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles*



# Dédicace

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère  
A mon père, école de mon enfance, , et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.

Que dieu les accueille dans son vaste paradis .

A ma sœur Salika qui ma toujours encourager

A mon frère Mohand, Wrida et mes petits frères  
et soeurs: Nabila, Zahra, salah, Ania, Arezki

A la famille de ma mère: Khabib Amokrane, Khalti  
taous, Saïd, Mourad, Ali, Farid, Fadila

A toute la famille Ait Oumghar

A toute la famille Ben Ammar

A mes tantes: na wardia et Khalti feroudja

A toute mes cousins et cousines.

A mon future marie Hacene et a tout ma belle famille

A mes très chères amies : Sara, Ryma, Imene, Moussa

A toute la promotion de pharmacie 2015 Blida

A mes chères binômes Manel et Khadidja qui ont partagé avec moi  
le meilleur et le pire lors de la réalisation de ce projet.

A tous ceux qui me sont chères.

A tous ceux qui m'aiment..

Je dédie ce travail.

**BIBA**

## *Dédicaces*

*Tout d'abord El Hamed Wa El Chokr lilah pour tout le bonheur de ma vie.*

*Je dédie cette thèse à ma mère qui m'a toujours aidé et soutenu, à mon père,*

*pour tous ses encouragements et son soutien, avec tout mon amour, merci pour tout.*

*A mes frères Hamid, Kamel, Brahim, Lotfi, Sofiane, Housseem et surtout Abdelkader et Ali.*

*à mes sœurs Fouzia et Fathia, vous m'avez transmis l'amour de la science et le savoir, merci.*

*Mes plus profonds remerciements vont, à mon grand père, mes grandes mères  
Mama Soultana et Mama Aicha, à mes oncles Missoum et Omrane et ma tante Aicha.*

*A mes belles sœurs Salima, Houria, Amel, et Nassima.*

*A tous les petits de ma famille Noussaïba, Ibtissem, Ferial, Anis, Wassim, Ibtihel, Amine,  
Ayoub, Marvita, Basât, Mohamed et Nehal, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès*

*A mes copines Khadidja et Ouahiba, qui m'ont partagé la réalisation de cette mémoire.*

*Merci*

*Hanen*

*Hana J. J. J.*

*Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire aux personnes les plus chers au monde et qui m'ont soutenu tout au long de ma vie : ma mère Khalil chorfi Fadhila, mon père BACHIR, mes sœurs :*

*NABILA ; RATIBA.*

*Je tiens aussi à dédier ce travail à mes cher binôme WAHIBA et MANEL qui à partagé avec moi le meilleure et le pire lors de la réalisation de ce projet*

*Sans oublier ma tante DJAHIDA RAZAL et AICHA HADJRI et mon oncle RADOUANE.*

*KHADIDJA.*

## Re-sumé

A fin d'étudier les caractéristiques épidémiologiques et de déterminer le mécanisme de résistance des entérobactéries aux carbapénèmes, nous avons réalisé une étude au niveau de laboratoire central de CHU Blida, unité Frantz Fanon, portant sur l'ensemble des entérobactéries isolées de différents types de prélèvements.

L'étude s'est répartie en deux volets, une étude rétrospective étalée sur une période de deux années, allant de Janvier 2012 à Décembre 2014 et une étude prospective ayant duré 04 mois, de Janvier 2015 à Avril 2015.

Notre travail a été réalisé sur 1943 entérobactéries isolées des prélèvements des patients hospitalisés et des patients externes ayant consulté au niveau du CHU Blida.

La recherche et l'identification des entérobactéries responsables d'infections a été effectué par l'examen cyto-bactériologique des différents types de prélèvements. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite selon les recommandations du CLSI.

La détermination de type de carbapénémase a été réalisé par teste de Hodge modifié et test à l'EDTA..

Les résultats obtenus montre un taux d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) de 1.28 %.

Les ERC sont plus fréquente chez les patients hospitalisés par rapport aux patients externes ; les ERC se trouvent le plus dans les services chirurgicaux, et prédominent au niveau des pus.

Les entérobactéries les plus fréquemment rencontrés sont *K. pneumoniae* et *E. cloacae*.

L'étude de mécanisme de résistance de ces souches vis à vis des carbapénèmes montre un taux élevé d'entérobactéries productrices de carbapénémase.

Ces souches résistantes représentent une menace réelle, l'usage contrôlé des antibiotiques associés à des mesures d'hygiène peuvent empêcher la sélection et la diffusion de ces souches multi résistantes.

**Mots clés :** Entérobactéries résistantes aux Carbapénèmes, entérobactéries, carbapénèmes, carbapénémases, Test de Hodge modifié, Test a l'EDTA.

## Abstract

In order to study the epidemiological characteristics and determine the mechanisms of resistance of the enterobacteria to carbapenems, we have to realize a study at the central laboratory of CHU Blida . Frantz Fanon unit .

About a group of isolated enterobacteria from different types of samples ; which is divided into two groups , which is divided into two groups :retrospective spread over a period of three years :from January 2012 to December 2014 ;a prospective study lasting four months from January 2015 to April 2015 .

Our work was realized on 1943 isolated enterobacteria samplings of hospitalized patients and patient consulted at the CHU Blida .

Our search and identifications of the enterobacteria responsible of infections carried by a cytobacteriological test of different types of samples.the study of the sensibility to the antibiotics was made according to the recommendations of CLSI .

The determination of type of carbapenems was realized by modified Hodge test and a test in LEDTA.

The obtained results show a rate of enterobacteria resistant to carbapenems ( ERC ) of 1.28% .

ERC are the most frequent in patients hospitalized compared to extern patient .ERC was founded the most in surgical services at the level of pus .

The most frequent enterobacteria founded are :*K. pneumoniae* , *E .cloacae* .

The study of mechanisms of resistance of these strains to carbapenems shows a high rate enterobacteria producers of carbapenems .

These resistant strains represent a threat ;the controlled usage of antibiotics associated with hygiene measures could prevent the selection and the diffusion of these multiresistant strains .

**Key words** :ERC.enterobacteria,carbapenems ;modified Hodge test,EDTA test.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I :</b> Caractères biochimiques des entérobactéries.....	03
<b>Tableau II :</b> La classification d'Amber des carbapénèmases.....	15
<b>Tableau III:</b> Méthodes de détection des carbapénèmases chez les entérobactéries .....	23
<b>Tableau IV:</b> Nombre et pourcentage d'entérobactéries (R + I) à l'imipénème entre 2009 et 2011 en Algérie.....	26
<b>Tableau V :</b> Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le service et le type de prélèvement.....	48
<b>Tableau VI:</b> Antibiorésistances des ERC et tests phénotypiques de détection de types de carbapénémase.....	50
<b>TableauVII:</b> Nombre d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes chez les patients hospitalisés entre 2009 et 2011 en Algérie .....	54
<b>Tableau VIII:</b> Taux des <i>K. Pneumoniae</i> résistante aux carbapénèmes dans différents pays.....	55



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01</b> : Test de Hodge modifié.....	18
<b>Figure 02</b> : Test de Rosco.....	21
<b>Figure 03</b> : Lecture de coloration de Gram.....	35
<b>Figure 04</b> : Aspect des colonies des entérobactéries sur GN . .....	35
<b>Figure 05</b> : Aspect des colonies des entérobactéries sur BCP.....	36
<b>Figure 06</b> : Aspect des colonies des entérobactéries sur Mac-conkey .....	36
<b>Figure 07</b> : Galerie classique.....	37
<b>Figure 08</b> : Lecture du test d'oxydase.....	37
<b>Figure 09</b> : Galerie API 20 E avant ensemencement.....	41
<b>Figure 10</b> : Galerie API 20 E après incubation.....	42
<b>Figure 11</b> : Antibiogramme avant incubation.....	44
<b>Figure 12</b> : Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes. ....	45
<b>Figure 13</b> : Entérobactéries résistantes à l'ertapénème +image de synergie.....	45
<b>Figure 14</b> : Test de Hodge modifié.....	46
<b>Figure 15</b> : Test d'inhibition par l'EDTA.....	46
<b>Figure 16</b> : Prévalence des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.....	47
<b>Figure 17</b> : Répartition des entérobactéries résistantes au carbapénèmes selon la provenance .....	49
<b>Figure 18</b> : Taux de résistance des ERC aux différentes molécules de la famille des carbapénèmes .....	51

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AARN**: Algerian Anti-bacterial Resistance Network.
- ABPA** : Acide aminophényl boronique.
- ADH** : Arginine déshydrogénase.
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- AMC** : Amoxicilline+Acide Clavulanique.
- AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- ATCC** : American Type Culture Collection
- BCP** : Pourpre de bromocrésol.
- BGN** : Bacilles à Gram Négatif.
- BLSE** : Bétalactamase à spectre élargi.
- BMR** : Bactéries multi résistantes
- BOR** : Acide Boronique.
- CAC** : Centre Anti Cancéreux.
- CHU** : Centre Hospitalo-Universitaire.
- CIT**: Citrate.
- CLSI**: Clinical and Laboratory Standard Institute.
- CLOX** : Cloxacilline.
- CMI**: Concentration minimale inhibitrice.
- ° :Degré.
- C**: Celsius.
- cm**:centimètre.
- CTX-M** : Céfotaximase-Munich.
- C3G** : Céphalosporines de troisième génération.
- DO**:Densité optique.
- DPA** : Acide dipicolinique.
- EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique.
- EIEC** : *Escherichia. Coli* entéro invasifs.
- EPEC** : *Escherichia. coli* Entéropathogène.
- EPC** : Entérobactéries productrices de carbapénèmes.

- ERC** : Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.
- ERT** : Ertapénème.
- GES** : Guiana Extended Spectrum
- GIM** : German imipenemase
- GN**: Gélose nutritif.
- H<sub>2</sub>S** : hydrogène sulfuré.
- IMI**: Imipénème Hydrolyzing B-lactamases.
- IMP**: Imipénème.
- IM+ED**: Imipénème+EDTA .
- KPC**: *Klebsiella pneumonia* carbapénémase.
- LDC**: Lysine décarboxylase.
- LPS**: Lipo polysaccharide.
- MBL**: Métallo bétalactamases .
- MER** : Meropénème.
- MH** : Muller Hinton.
- mn**: minute.
- ml**: millilitre.
- µm**: micro mètre.
- NDM** : New Delhi métallo- Bétalactamase .
- NMC**: Not métallo enzyme carbapénémase.
- ODC** :Ornithine décarboxylase.
- OMS** : Organisation mondiale de santé.
- ONERBA** : Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques.
- ONPG** : Ortho-nitrophényl-pyrano galactoside.
- OXA** : Oxacillinases .
- PCR** : Polymérase chain réaction.
- PLP** : Protéines liant la pénicilline.
- RM** : Rouge de méthyl.
- SHV** : Sulf Hydryl Variable.
- SME** : *Serratia marcesens* enzyme.
- sp** : speaces
- TDA**:Tryptophane désaminase..
- TEM** :Temoneira (nom du patient).
- TH** : Test de Hodge.

**TSI** : Triple-Sugar-Iron.

**VIM** : Verona Imipénèmase.

**VP** : Voges Proskauer.

TABLE DES MATIERES

**Introduction**

**Partie bibliographique**

**Chapitre I : Généralités.....1**

I.1. Entérobactéries.....1

I.1.1. Définition.....1

I.1.2. Classification.....1

I.1.3. Habitat.....1

I.1.4. Les caractères bactériologiques.....2

I.4.1.1. Les caractères morphologiques.....2

I.4.1.2. Les caractères cultureux.....2

I.4.1.3. Les caractères biochimiques.....2

I.4.1.4. Les caractères antigéniques.....3

I.4.1.5. Les facteurs de virulence.....4

I.1.5. Pouvoir pathogène.....4

I.2. Les Antibiotiques :.....6

I.2.1. Définition.....6

I.2.2. Classification.....6

I.2.2.1. Les différentes types de classification.....6

I.2.2.2. Les principales classes d'antibiotique.....6

I.2.3. Mécanisme d'action des antibiotiques.....9

I.2.3.1. Antibiotiques agissant sur la paroi.....9

I.2.3.2. Antibiotiques agissant sur la synthèse protéique.....9

I.2.3.3. Antibiotiques agissant sur les acides nucléiques.....9

I.2.3.4. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique.....9

I.2.4. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....10

I.2.4.1. Définition.....10

I.2.4.2 Types de résistances.....10

I.2.4.3. Mécanismes de résistances aux antibiotiques.....10

I.2.4.3.1. Synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique.....10

I.2.4.3.2. Modification de la cible.....11

I.2.4.3.3. Diminution des antibiotiques atteignant la cible.....	11
<b>Chapitre II :Entérobactéries et Carbapénèmes :.....</b>	<b>13</b>
II.1. Mécanisme de résistance des entérobactéries aux carbapénèmes.....	13
II.1.1. Association des mécanismes.....	13
II.1.1.1. Hypersécrétion de céphalosporinases et/ ou BLSE.....	13
II.1.1.2. Imperméabilité de la paroi bactérienne.....	14
II.1.1.3. Résistance composite.....	14
II.1.2. Carbapénémases.....	14
II.1.2.1. Définition.....	14
II.1.2.2. Classification des carbapénémases .....	15
II.2. Méthodes de détection des carbapénémases.....	17
II.2.1. Méthodes phénotypiques.....	18
II.2.1.1. Test de Hodge modifié.....	18
II.2.1.2. Tests d'inhibition .....	19
II.2.1.3. Test de Rosco.....	20
II.2.2. Méthodes génotypiques(méthodes moléculaires).....	22
<b>Chapitre III :Epidémiologie.....</b>	<b>24</b>
III.1. Portage.....	24
III.2. Mode de transmission.....	24
III.3. Données épidémiologiques.....	24
<b>Chapitre IV :Traitement et Prévention .....</b>	<b>28</b>
IV.1. Traitement.....	28
IV.1.1. Les règles d'utilisation des carbapénèmes.....	28
IV.1.2. Traitement des infections à Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes .....	28
IV.1.2.1. Traitement actuelle.....	28
IV.1.2.2. Perspectives.....	29
IV.2. Prévention.....	30
IV.2.1. Isolement de contact.....	30
IV.2.2. Le dépistage.....	31
IV.2.3. Décolonisation ou chimio décontamination des porteurs.....	31
IV.2.4. L'information.....	32
IV.2.5. Lutte pour un usage raisonné des antibiotiques.....	32
IV.2.6. Lutte contre le péril fécal.....	32

IV.2.7.La surveillance.....	32
<b>Partie Pratique</b>	
<b>Chapitre V : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>33</b>
V.1. Protocole et durée de travail .....	33
V.2. Matériels .....	33
V.2.1. Appareillage .....	33
V.2.2 .Matériels non biologiques.....	33
V.3.2. Matériels biologiques.....	33
V.3. Méthodes : Etude Bactériologique.....	33
V.3.1.Examen microscopique.....	33
V.3.1.1.Examen à l'état frais.....	33
V.3.1.2.Examen après coloration.....	34
V.3.2.Isolement.....	35
V.3.3.Identification Biochimique.....	36
V.3.3.1.Galerie Classique.....	37
V.3.3.2.Galerie Api E 20.....	41
V.3.4.Etudes de sensibilité aux antibiotiques.....	42
V.3.4.1 Antibiogramme.....	42
V.3.4.2 Les tests complémentaires pour la détection de type de carbapénémase.....	45
<b>Chapitre VI : Résultats.....</b>	<b>47</b>
VI.1.Les caractéristiques épidémiologiques des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.....	47
VI.2.Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon la provenance des prélèvements (externes /internes).....	48
VI.3.Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le service.....	49
VI.4.Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le type de prélèvement dont ils sont issus.....	49
VI.5.Répartition des isolées entérobactéries résistantes aux carbapénèmes par genre bactérien.....	49
VI.6.Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et antibiotiques.....	49
<b>Chapitre VII : Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusion.</b>	

# Introduction



# INTRODUCTION

La famille des entérobactéries est une famille bactérienne importante, elle comprend une grande variété d'espèces (plus de 40 genres). Nombreuses espèces de ces entérobactéries sont commensales du tube digestif dont *Escherichia coli* représente l'espèce type, d'autres sont responsables de diverses infections communautaires et hospitalières.

Les carbapénèmes sont des  $\beta$ -lactamines possédant un très large spectre antibactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases. Pour cette raison, ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères, et dans le cas d'infections documentées à germe producteur de BLSE.

Comme pour toutes les  $\beta$ -lactamines mises sur le marché, des souches résistantes sont rapidement apparues. La résistance aux carbapénèmes avait en effet été décrite depuis longtemps chez *Enterobacter.sp*, espèce plus spécifiquement nosocomiale, sur exprimant une résistance  $\beta$ -lactamase de type céphalosporinase associée à l'acquisition d'une imperméabilité aux  $\beta$ -lactamines et en particulier, aux carbapénèmes. Toutefois, le phénomène restait assez marginal et relativement peu inquiétant car il ne s'agissait que de mécanismes de résistance non transmissibles. La nouveauté est la description de plus en plus fréquente de souches résistantes aux carbapénèmes par acquisition de carbapénémases. (N. Grall et al 2011)

Le traitement des infections dues à entérobactéries productrices de carbapénémases est devenu plus difficile, car la plupart de ces bactéries sont également résistantes à de nombreux antibiotiques et parfois à tous les antibiotiques. La principale menace pour le futur est l'émergence, d'entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC). (M. Wolff et al 2009)

Nous rapportons dans ce travail réalisé au laboratoire central de CHU Blida unité FRANTZ FANON les caractéristiques épidémiologiques ainsi que les méthodes utilisées pour la détection des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

# Partie Bibliographique

# Chapitre I

## Généralités

---

## CHAPITRE I :GENERALITES

### I.1.Les Entérobactéries :

#### I.1.1.Définition :

Les entérobactéries constituent l'une des familles les plus importantes dans le monde bactérien.

Cette famille comprend de nombreux genres répondant aux critères suivants :

- Bacilles à Gram négatif .
- Aéro-anérobies facultatifs.
- Mobiles ou immobiles.
- Facilement cultivables .
- Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz .
- Réduisent les nitrates en nitrites .
- Dépourvus d'oxydase.( **J-P.Larpent 2000 ;J-P.Fauchère et J-P.Avril 2002**)

#### I.1.2.Clasification :

La classification adoptée est celle du Bergey's Manuel of systematic bacteriology 2004 :

- Groupe :Procaryste
- Domaine :Bacteria
- Classe : Gammaprotobacteria
- Ordre :*Enterobacterial*
- Famille :*Enterobacteriaceae*

La famille des enterobacteriaceae compte environ 44 genres dont environ 12 présentant un intérêt en bactériologie clinique :

- Escherichia* :*Escherichia coli*.
- Salmonella* :*Salmonella enterica* sérovar ( typhi , *paratyphi* A,B ,C),sérovar *Typhimurium* ,sérovar *Enteridis* et nombreux autres sérovar.
- Shigella* :*S.dysenteriae* , *S.flexnerie*, *S.boydii*, *S.sonneii*.
- *Yersinia*: *Y.enterocolitica* , *Y.pseudotuberculosis* ,*Y.pestis*.
- Klebsiella* :*K. pneumoniae* ,*K. oxytoca* ,*K.planticola*,*K.terrigena*.
- *Enterobacter* : *E. aerogenes* et *E. cloacae*.

Autres :*Citrobacter*,*Serratia*,*Proteus*,*Providencia*,*Morganella* et *Hafnia*.(**J-P.Larpent 2000 , J- L. Fauchère et J-P.Avril 2002**)

#### I.1.3.Habitat :

De nombreuses espèces de la famille des *Entérobactéries* sont des hôtes du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux d'où leur appellation.

Ce sont des bactéries très ubiquitaires, certaines espèces sont des saprophytes (*Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*), d'autres sont des pathogènes spécifiques (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), mais la plupart des espèces sont commensales (*Escherichia coli*). (G.Culymata 2007 ,H.Denis et al 2007)

#### **I.1.4. Les caractères bactériologiques :**

##### **I.1.4.1 Caractères morphologiques :**

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif avec des extrémités arrondies de 0.5-1.5µm d'épaisseur et de 2-4µm de longueur ,ces dimensions varient selon l'âge de la culture,l'espèce et la souche.(L.Minor et M.Viron1989)

Certaines entérobactéries sont mobiles grâce à des flagelles disposés de manière péritriche (*Salmonella* ,*E.coli*) d'autres sont immobiles (*Shigella*),les espèces *Hafnia alviae* et *Yersinia pseudotuberculosis* sont mobiles à 25-30°C et immobiles à 37°C.

Certaines entérobactéries comme *Klebsiella* peuvent produire des exopolysaccharides a leur surface formant une capsule (B.Joly et A.Reynaud 2003).

Les entérobactéries sont asporulées .

##### **I.1.4.2. Caractères cultureux :**

Les entérobactéries sont aéro-anaérobies facultatifs ,toutes les bactéries de cette famille se cultivent facilement sur des milieux de culture simple à PH neutre ,leur croissance est rapide ,le temps de division moyen des entérobactéries est de l'ordre de 20-30mn.

La gélose Hektoen est le milieu sélectif permettant l'isolement et la différenciation des entérobactéries a partir des différents prélèvements biologiques.

Les entérobactéries peuvent avoir plusieurs aspects sur ce milieu  
(J-P. Avril et H.Debernat 1992 ,B.Joly et A.Reynaud 2003)

##### **I.1.4.3. Caractères biochimiques :**

En plus des caractères biochimiques communs à savoir :Glucose +,nitrate réductase +,oxydase - ,catalase + ;il y'a d'autres caractères biochimiques qui permettent de différencier les genres et les espèces de la famille des entérobactéries .

Ces caractères sont résumés dans le tableau ci –dessous :

**Tableau I :**Caractères biochimiques des entérobactéries (original)

Genres Caractères biochimiques	<i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Providencia</i>
ONPG	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
VP	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
RM	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Citrate	-	D	-	+	D	+	+	-	+	+
Indole	+	-	D	D	D	-	-	D	D	+
Uréase	-	-	-	+	+	-	-	+	-	D
Lactose	+	-	-	+	-	+	D	-	D	-
Gaz	+	D	-	+	+	+	D	-	+	D
H <sub>2</sub> S	-	D	-	-	D	-	-	-	D	-
LDC	+	D	-	D	-	D	D	-	-	D
ODC	+	+	D	-	D	+	D	D	+	D
TDA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

+ :positif - :négatif D :variable selon les espèces

#### I.1.4.4.Caractères antigéniques :

- **Antigène commun : «antigène de kunin»**

Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries, de ce fait il a un intérêt taxonomique. Il est généralement sous forme hapténique non immunogène mais il a cependant la capacité de sensibiliser les hématies.

- **Antigènes somatiques :« antigène O »**

Cet antigène, qui est présent chez toutes les entérobactéries, est localisé sur la paroi bactérienne.

Il s'agit du lipopolysaccharide (LPS), c'est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, thermostable et résiste à l'alcool et l'acide.

Ils ont un intérêt diagnostique et permet l'identification des différents sérovars (sérotypes).

Exp : *Escherichia* (O : 180) et *Salmonella* (O : 67)

- **Antigènes flagellaire : « antigèneH »**

Il est de nature protéique, l'élément de base est la flagelline, leur association forme le flagelle.

Il n'existe que chez les souches mobiles.

Exp : *E. coli* (H : 56)

- **Antigène de surface:**

C'est un antigène facultatif. Sa présence est en relation avec la virulence.

-**Antigène polysaccharidique « antigène K »** c'est l'antigène capsulaire qui peut masquer complètement l'antigène O sous-jacent. L'antigène K est particulièrement développé chez *Klebsiella* et chez certaines souches d'*E. Coli* (*E. coli* K1) où il constitue une véritable capsule. Chez *Salmonella*, notamment *Salmonella typhi*, il est appelé antigène Vi.

- **Antigènes protéiques : « Pili ou fimbriae »** en majorité filamenteux et répartis sur toute la surface cellulaire. (J-P. Avril et H.Debernat1992 ; J-L.Fauchère et J-P.Avril 2002 ;B.Joly et A.Reynaud 2003).

**Remarque:**

Le sérotype est la combinaison des antigènes somatiques, flagellaires et de surface.

Exp : *E. coli* (O : 157, H : 7)

**I.1.4.5.Les facteurs de virulences :**

Pour les *Enterobacteriaceae* , on connaît un grand nombre de facteurs de virulence qui jouent un rôle dans la pathogénie des différentes maladies infectieuses,il faut citer :

- La capsule : elle est de nature polysaccharidiques. La capsule rend la phagocytose plus difficile et inhibe l'action du complément,on la trouve chez *E.coli* de type K1 .

- Les adhésines : se présente sous forme de fimbriae , elle peut induire une adhésion à des globules rouges ou à des cellules épithéliales en culture.

On les trouve à des nombre variable chez *E.coli* et *Salmonella*.(C.Nauciel 2000)

- Les Toxines : Certaines souches peuvent produire une entérotoxine thermolabile ou thermostable (*E.coli*) , *Shigella dysentrie* produit une toxine shiga ,cette toxine inhibe la synthèse proteique des cellules eucaryotes.

-Les hémolysines .(H.Fritz , Kayser 2003)

**I.1.5.Pouvoir pathogène :**

- *E .coli:*

-C'est la bactérie le plus souvent en cause dans les infections urinaires communautaires qu'elles soient basses (cystite) ou hautes (pyélonéphrite).

-Elle peut être responsable de gastro-entérite ( *E.coli* entéropathogène (EPEC) ,*E.coli* entéro-invasif (EIEC))ayant des traductions cliniques variables : diarrhée d'allure banale, diarrhée sanglante,diarrhée cholériforme.

- Elle peut être responsable de méningite ou de septicémie ( *E.coli* K1) .

- **Salmonella :**

- Sérovars typhi et paratyphi A ,B ou C, sont responsables de fièvre typhoïde et paratyphoïdes qui est une infection bactérienne des voies intestinales et du courant sanguin, les symptômes peuvent être grave (fièvre, malaise, anorexie, céphalées...) , la maladie est devenue rare dans les pays industrialisés, où la plus part des cas sont importés.

- Autres sérovars , dans nos régions *S. enterica* sérovars thyphimurium et sérovar enteridis sont fréquemment impliqués dans les infections intestinales.

- **Shigella :**

- Les infections à shigella sont très fréquentes dans les pays en voie de développement, les shigelles sont responsables d'une partie des diarrhées des voyageurs.

- *S. dysenteriae*, sérotype 1 est responsable de dysenterie bacillaire (elle se traduit par des douleurs abdominales, de la fièvre et l'émission de selles afécales faites de glaires mucosanglantes).

- **Yersinia :**

- *Y. pestis* est responsable de peste bubonique (se traduit par une adénopathie inflammatoire dans le territoire de la pique et un syndrome infectieux sévère).

Des localisations secondaires, notamment pulmonaires, peuvent survenir la mortalité est importante.

- **Klebsiella- Enterobacter- Serratia :**

Très souvent responsables d'infections nosocomiales , la localisation d'infection dépend de l'activité du service hospitalier : infections urinaires après manœuvres instrumentales ; infections respiratoires dues à l'emploi d'appareils de ventilation artificielle ; surinfections des plaies par des antiseptiques contaminés ; septicémies compliquant les infections précédentes ou consécutives à l'usage de cathéters. (J-L Avril et al 1992)



## I.2.LES ANTIBIOTIQUES

### I.2.1.Définition:

On appelle antibiotique toute substance naturelle ou synthétique ; capable de tuer ou d'inhiber la multiplication des bactéries.

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries en bloquant une étape essentielle de leur développement. (O.Talbert et al 2011)

### I.2.2.Classification:

#### I.2.2.1. Les différents types de classification :

La classification des antibiotiques peut s'effectuer selon divers critères:

- **Mode d'action:**

Il existe des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi en bloquant l'activité des protéines de liaison à la pénicilline PLP (les bêta-lactamines), d'autres se fixent sur la membrane cytoplasmique et perturbent sa perméabilité (polymixines), ou en inhibant la synthèse des protéines (aminosides), aussi existe des antibiotiques qui inhibent la synthèse ou le fonctionnement des acides nucléiques. (M.Schordert 1989)

- **Origine:**

Élaboré par un organisme naturel ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).

- **Le spectre d'activité:**

Liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

- **La nature chimique :**

Est basée souvent sur une structure de base, permet de classer les antibiotiques en familles.

#### I.2.2.2. Les principales classes d'antibiotique :

- **Les bêtalactamines:**

Il s'agit d'une famille qui comprend 5 groupes:

**Les Pénams:** ce groupe subdivisé en plusieurs sous-groupes:

**-Pénicilline G :**

Chef de file: Benzylpénicilline, Elle a un spectre d'activité étroit. Les entérobactéries sont naturellement résistantes à la pénicilline G.

**-Pénicilline M:** Méticilline, Oxacilline

Elle peut résister à la pénicillinase des staphylocoques. Leur spectre est étroit, identique à celui de pénicilline G mais les CMI sont plus élevées. (J-L.Fauchère et J-P.Avril 2002)

**- Aminopénicilline :** Ampicilline, Amoxicilline

Elles ont un spectre élargi, par rapport à la pénicilline G, vers certains bacilles à Gram (-) (*E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*), mais elles restent sensibles aux  $\beta$ -lactamases souvent présentes chez ces bactéries. (B.Rouveix, 1990 ; C.Carbon et al, 1995 ; C.Nauciel, 2000).

**-Acyl-uréido-pénicilline :** Ticarcilline, Pipéracilline

Utilisé pour lutter contre les entérobactéries productrices de céphalosporinase et les bacilles à Gram (-) résistants aux aminopénicilline. (C.Carbon et al, 1995)

**-Amindino-pénicillines:** Mécillinam, Pivmécillinam

Elles sont actives sur certaines entérobactéries (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) qui ne présentent pas un niveau de production bêta-lactamases trop élevée. (M.Neumann, 1990 ; C.Nauciel, 2000).

**Les céphems :** ils sont subdivisés en 4 générations**-Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération:** Céfalotine, Céfazoline

Ils résistent à l'action de pénicillinases produites par certains bacilles à Gram (-) (entérobactéries). Ils peuvent ainsi être actifs sur les souches résistantes aux pénicillines.

**-Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération:** Céfoxitine, Céfuroxime

Ils se distinguent des précédents par une relative résistance aux céphalosporinase. Actives sur les entérobactéries BLSE (bêta-lactamases à spectre élargi). (L.Minor ; M.Veron 1989).

**-Céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération:** Céfotaxime, Ceftazidime

Ils sont actifs sur les bactéries à Gram (-) avec des CMI basses, résistants à beaucoup de  $\beta$ -lactamases.

Ils sont inactifs sur les bactéries hyperproductrices de céphalosporinase (*Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*).

**-Céphalosporines de 4<sup>ème</sup> génération:** Cefpirome, Céfépime

Ils sont actifs sur bactéries à Gram (+) et (-) ; ils résistent aux bêta-lactamases et aux céphalosporinase.

**Oxapénames :** (inhibiteur des bêta-lactamases) acide clavulanique, sulbactam.

Activité antibactérienne faible, inhibe la majorité des pénicillinases et un faible nombre de céphalosporinase.

Utilisée en association avec les pénicillines (Amoxicilline+ acide clavulanique, sulbactam+ ampicilline).

**Les monobactams:** Aztréonam

Active uniquement sur bacilles à Gram (-).

**Les carbapénèmes:**

Sont des bêtalactamines possédant un très large spectre antibactérien doublé d'une grande stabilité envers la quasi-totalité des  $\beta$ -lactamases, pour cette raison, ils font partie des antibiotiques utilisés en première ligne au cours du traitement probabiliste des infections nosocomiales sévères.

Trois molécules sont commercialisées : l'imipénème, le méropénème, et l'ertapénème et le doripénème est en voie de l'être.

Leur spectre in vitro couvre la plupart des bactéries y compris les anaérobies, les exceptions notables étant les staphylocoques résistant à la méticilline, *S.maltophilia*, *E.faecium* et pour l'ertapénème, *P.aeruginosa*.

La principale menace pour le futur est la diffusion d'entérobactéries productrice de carbapénémase. (M. Wolff et al2009)

- **Les Aminosides:** Gentamycine, Kanamycine

Sont souvent utilisé en association avec d'autre antibiotique ; leur spectre est large (lesbactéries à Gram (+) et (-).

- **Les glycopeptides:** Vancomycine, Teicoplanine

Agissent sur les bactéries à Gram (+).

- **Les macrolides** (Erythromycine, Clarithromycine), **Lincosamides** (Clindamycine, Lincomycine) et **Streptogramines** (pristinamycine) :

Actifs sur les cocci à Gram + (Staphylocoque, Streptocoque) et les cocci à Gram – (Neisseria).

- **Les cyclines :** Doxycycline, Tétracycline.

Ils sont utilisés contre les bactéries à multiplication intra cellulaire (Chlamydia).

- **Les phénicolés:** Chloramphénicol, Thiamphénicol.

Leur spectre d'action est les bactéries à Gram (+) et (-).

- **Les oxazolidinone:** Linozolid

le spectre d'action est les bactéries à Gram (+).

- **Les polypeptides:** Polymixines

Agissent sur les bactéries à Gram (-).

- **Les sulfamides :** Sulfamethoxazole

le spectre d'actions les bactéries à Gram (+) et (-). (L.Minor et M.Veron1989)

- **Autres antibiotiques :** Fosfamycine ; Rifampicine, Daptomycine.....etc.

**I.2.3.Mécanisme d'action des antibiotiques :****I.2.3.1.Antibiotiques agissent sur la paroi (inhibent la synthèse du peptidoglycane)**

Le peptidoglycane est un polymère réticulé fait de chaînes polysaccharidiques il assure la rigidité de la paroi. De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane dont les bêtalactamines ; ces derniers se fixent de manière covalente sur des protéines membranaires, appelées protéines de liaison à la pénicilline (PLP). Ces protéines sont des enzymes impliquées dans la phase finale de synthèse du peptidoglycane, leur activité est inhibée par leur liaison avec les bêtalactamines. (M.Schordert1989)

**I.2.3.2. Antibiotiques inhibent la synthèse protéique :**

- **Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 30 S du ribosome :**

Ils se lient à plusieurs sites au niveau de la sous unité 30 S du ribosome et déforment sa structure ce qui perturbe la phase d'initiation de la synthèse protéique.

- **Antibiotiques se fixant sur la sous-unité 50 S du ribosome:**

Ils se lient de manière réversible à la sous unité 50 S des ribosomes .il bloque le site P inhibant ainsi les réactions de transpeptidation et translocation.(M.Schordert 1989)

**I.2.3.3.Antibiotiques agissent sur les acides nucléiques :**

- **Antibiotiques inhibent la synthèse d'acide nucléique :**

La synthèse des acides nucléiques ADN et ARN est un métabolisme vitale pour les cellules, Certains antibiotiques peuvent bloquer ces voies de biosynthèse.

- **Rifampicine** inhibe l'initiation de la transcription par inhibition de l'ARN polymérase.
- **Quinolones** inhibent la réplication d'ADN par inhibition des topoisomérases.

- **Antibiotiques perturbe le fonctionnement d'acide nucléique : Nitroimidazolé**

Provoque la fragmentation de l'ADN.

**I.2.3.4.Antibiotiques agissent sur la membrane cytoplasmique: Polymixines ;**

L'existence d'une membrane cytoplasmique intacte est nécessaire à la survie bactérienne; il existe un certain nombre d'antibiotique qui agissent sur la membrane comme détergent.

(C.Nauciel 2008)

## **I.2.4. La résistance des bactéries aux antibiotiques :**

### **I.2.4.1. Définition:**

Une espèce bactérienne est dite « résistante » à un antibiotique si elle est capable de se multiplier et de croître en présence de concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe la croissance des autres souches de la même espèce. (J-L.Fauchère et J-P.Avril, 2002) cette résistance se caractérise par son caractère naturel ou acquis, son mécanisme et son support génétique.

### **I.2.4.2. Les types de résistances :**

- **La résistance naturelle:**

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Cette résistance ne pose pas de problème réel car elle est prévisible. (L.Minor et M.Veron1989 ; D.Yala et al 1999 ; J.Figarella2001)

Exemple : *Citrobacter diversus*, est naturellement résistant aux amino-uréido et carboxy-pénicillines par l'action d'une pénicillinase naturelle produite à bas niveau.

- **La résistance acquise :**

La résistance acquise est une propriété nouvelle qui apparaît au sein d'une population bactérienne théoriquement sensible en raison d'une modification génétique, cette résistance correspond à une adaptation des bactéries aux antibiotiques (B.Rouveix1990)

Elle résulte soit d'une mutation chromosomique soit de l'acquisition d'un gène exogène qui rend la bactérie résistante à l'antibiotique.

Exemple : résistance acquise aux aminopénicillines (amoxicilline) et carboxypénicilline (Ticarcilline) chez *E. coli*.

### **I.2.4.3. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques :**

Les principaux mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques sont :

#### **I.2.4.3.1. Synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique :**

Certaines souches bactériennes produisent des enzymes qui vont inactiver l'antibiotique. C'est le mécanisme de résistance le plus répandu (B.Rouveix1990).

**Les  $\beta$ -lactamases :** détruisent les  $\beta$ -lactamines par ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, elles peuvent être chromosomiques ou plasmidiques.

- **$\beta$ -lactamases chromosomiques :**

Ces enzymes sont souvent des céphalosporinase (les céphalosporines sont leurs substrats préférentiels).elles inhibent l'ATB en hydrolysant ou en bloquant leur fixation ultérieure sur les PLP.

Ces enzymes sont naturellement présents chez beaucoup d'entérobactéries (*Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* indologènes).

- **$\beta$ -lactamases plasmidiques :**

Ces enzymes sont surtout des pénicillinases hydrolysant les pénicillines mais certaines aussi les céphalosporines.

Ces enzymes sont notamment produites par les entérobactéries.

Exemple : *Enterobacter cloacae* produit une pénicillinase type TEM1 (Temoneira1).

(J-L.Fauchère et J-P.Avril, 2002)

- **Les carbapénèmases :**

Ces enzymes hydrolysent principalement les carbapénèmes mais certaines peuvent hydrolyser d'autres bêta-lactamines.

#### **I.2.4.3.2.Modification de la cible :**

La modification de la cible se produit lorsqu'un antibiotique donné ne peut plus se lier à la cible sur laquelle il agit habituellement.

À titre d'exemple :

-Le pneumocoque devient résistant à la pénicilline ou aux céphalosporines au moment où la capacité de ces antibiotiques de s'attacher à leurs sites de liaison habituels PLP est compromise.

- Des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires (présents hors de l'hôpital), ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M et les autres  $\beta$ -lactamines par la présence d'une nouvelle PLP(PLP2a), ayant une faible affinité pour ces antibiotiques. (A.Ros 1999)

#### **I.2.4.3.3.Diminution des antibiotiques atteignant la cible :**

- **Diminution de perméabilité :**

Chez les bactéries à Gram négatif, la pénétration des molécules hydrophiles, à travers la membrane externe constituée de phospholipides s'effectue à travers les porines. La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines dépend du nombre de porines fonctionnelles. L'altération des porines par mutation est à l'origine de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines, soit par une modification structurale d'une des porines essentielles, ce qui a été décrit chez *E. coli*, soit par

une diminution quantitative des porines, qui est la situation la plus fréquente (J-D.Cavallo et al, 2004).

- **Mécanisme d'efflux :**

La résistance par système « efflux » de découverte plus récente, apparaît être le principal mécanisme de résistance chez les bactéries à Gram négatif. divers gènes codant pour des protéines membranaires permettant l'efflux d'antibiotiques hors de la cellule et donc empêchent son accumulation intracellulaire.

Chez *E. coli*, ce système augmente le niveau de la résistance à des nombreux antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines.

Chez le pneumocoque, ce système permet d'expulser les macrolides, l'empêchant ainsi d'atteindre leur cible. (A.Philippon 2008)

# Chapitre II

## Entérobactéries et Carbapénèmes

© 2010, Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés. Toute réimpression ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de l'éditeur est formellement interdite.



## CHAPITRE II : ENTEROBACTERIES ET CARBAPENEMES

### II.1.Mécanisme de résistance des entérobactéries aux carbapénèmes :

Les carbapénèmes sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches de bactéries résistantes également aux carbapénèmes.

Chez les entérobactéries, cette résistance est principalement due à deux mécanismes impliquant des  $\beta$ -lactamases.

Le premier associe la production d'une céphalosporinase (chromosomique ou plasmidique) et / ou d'une BLSE à une diminution de perméabilité membranaire par perte ou altération de porines ; le second mécanisme met en jeu des  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser fortement les carbapénèmes nommées carbapénémases. (G. Cuzon , T. Naas, P. Nordmann 2009)

#### II.1.1.Association de mécanismes :

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries est majoritairement due à des associations de mécanismes de résistance, associant fréquemment la production de  $\beta$ -lactamases à un déficit ou une altération des porines membranaires. (N. Grall et al 2011)

##### II.1.1.1.Hypersécrétion de céphalosporinase et/ou BLSE :

- **Bétalactamases à spectre étendue (BLSE) :**

Les bétalactamases sont des enzymes capables d'hydrolyser ou d'inactiver le cycle betalactame .elles constituent le principal mécanisme de résistance aux bétalactamines chez les entérobactéries. (Najiby Kassis-Chikhan 2013)

Les entérobactéries productrices de bétalactamases à spectre étendue (BLSE) possèdent des enzymes qui hydrolysent les pénicillines et les céphalosporines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes , exemples :*E. coli* TEM1(Temoneira - nom du patient) .*K.pneumoniae* SHV2(Sulf Hydryl Varia BLE).

(A.Durand 2014).

- **Hypersécrétion de céphalosporinase :**

Les céphalosporinases sont généralement chromosomiques et inductibles .Elles sont codées par des gènes appelés AMPc.Elles hydrolysent préférentiellement les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération.

La production des céphalosporinases est sous le control de différents gènes qui -s'ils sont mutés - vont aboutir à une hyperproduction spontanée de niveaux variables de céphalosporinase .Une fois hyper produites , elles peuvent hydrolyser les céphalosporines de

3<sup>ème</sup> génération et entrainer la résistance à ces antibiotiques .(Seck rose 2005)  
Ce type d'enzymes lors d'hyperproduction conduit à un phénotype de résistance plus étendue ou large que celui d'une BLSE .

Aujourd'hui il existe des céphalosporinases plasmidiques dont leur phénotype de résistance est similaire à celui d'une céphalosporinase chromosomique hyper produite. ( Najiby Kassis-Chikhan 2013)

#### **II.1.1.2.Imperméabilité de la paroi bactérienne :**

Imperméabilité ou défaut de perméabilité membranaire est due à une altération qualitative ou quantitative des porines membranaires, voie de pénétration des carbapénèmes dans la bactérie. (BOUTET-DUBOIS et al 2012)

C'est-à-dire modification structurelle d'une porine essentielle ou plus fréquemment diminution quantitative des porines. (N.Grall et al2011)

#### **II.1.1.3.Résistance composite :**

Les souches hyperproductrices d'AmpC et productrices de BLSE restent sensibles à l'imipénème, Lorsqu'une altération des porines est associée, ces souches peuvent alors devenir de sensibilité intermédiaire ou résistantes aux carbapénèmes .

Ce phénotype de résistance composite a été observé chez des souches hyperproductrices de céphalosporinase chromosomique comme *E.aerogenes* et *E. cloacae*, ainsi que chez des souches ayant acquis une céphalosporinase plasmidique comme *E. coli* ,*K. pneumoniae* et *S. enterica* sérovar Wien .

Ce phénotype de résistance a également été décrit chez des souches d'*E. coli* et de *K.pneumoniae* productrices de BLSE ,respectivement de type CTX-M-2 (Céfotaximase-Munich) et SHV-2 (Sulf Hydryl Variable).(N.Grall et al 2011)

Chez *Enterobacter cloacae* ou *E. aerogenes*, la perte d'une porine (38 kD) associée à une hyperproduction de la  $\beta$ -lactamase chromosomique de type céphalosporinase permet l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes.(A.Philipon 2005)

#### **II.1.2.Les carbapénémases :**

##### **II.1.2.1.Définition :**

Les carbapénémases sont des  $\beta$ -lactamases définies sur la base d'un spectre enzymatique (hydrolyse au moins un carbapénème) et non sur une base structurale .Elles sont ainsi retrouvées au sein de classe A, B, D de la classification d'Ambler.(N.Grall et al2011)

Elles sont stables et surviennent chez des souches qui sont très souvent multi résistantes à d'autres familles d'antibiotiques, cette multirésistance est liée en grande partie à la localisation plasmidique de ces gènes.

Ils sont importants du point de vue clinique car ils compromettent le plus souvent l'efficacité de presque toutes les  $\beta$ -lactamines.

Ces carbapénémases sont identifiées de façon croissante chez les entérobactéries (P.Nordmann et al 2012)

### II.1.2.2. Classification des carbapénémases :

Les carbapénémases décrites chez les entérobactéries appartiennent aux trois classes connues de bêta-lactamases (classe A, B, D de la classification d'Amblar).

Les bêta-lactamases classe A ont une activité qui est totalement ou partiellement inhibée in vitro par l'acide clavulanique et le tazobactam contrairement aux autres classes.

**Tableau II :** La classification d'Amblar des carbapénémases

Classification d'Amblar	Types d'enzymes	Spectre	Germe
A type sérine	KPC	Toutes les B-lactamines	Entérobactéries
A type sérine	SME	Carbapénème et aztréonam mais pas C3G	<i>S. marcescens</i>
A type sérine	NMC-A,IMI	Carbapénème et aztréonam mais pas C3G	<i>Enterobacter.sp.</i>
A type sérine	GES	Imipénème C3G	<i>Ps. Aeruginosa</i> Entérobactéries
B métallosé- lactamase	IMP ,VIM	Toutes les $\beta$ -lactamines sauf aztréonam	Entérobactéries <i>Pseudomonas.sp.</i> <i>Acinetobacter.sp.</i>
D type sérine	OXA	Carbapénème (faible activité)	<i>Acinetobacter.sp</i> Entérobactéries

J. B. Patel Jour. Clinica lMicrobiology Newsletter Vol. 31 N°8 (2009)

**KPC** :*Klebsiella pneumoniae* Carbapénémase , **SME** :*Serratia marcescens* enzyme ,**NMC** :Not métallosé enzyme Carbapénémase **IMI** :Imipénème hydrolyzing  $\beta$ -lactamases, **GES** :Guiana Extende Spectrum, **IMP** :Active on imipenem ,**VIM** :Verona Imipenemase **OXA** :Oxacillinase.

R ! Les plus importantes, cliniquement, sont les carbapénémases de type KPC, IMP/VIM et OXA-48.

- **Les carbapénémases de classe A :**

Carbapénémases de classe A ou sérine pénicillinase ; sont des enzymes à sérine, elles hydrolysent à des degrés divers les bêta lactamines ( KPC hydrolyse toutes les bêta-lactamines ; SME -NMC-A – IMI hydrolysent les carbapénèmes et l'aztréonam ; GES hydrolyse l'imipénème et C3G).

Leur activité est inhibée par l'acide clavulanique et l'acide boronique.

Les gènes de ces enzymes sont chromosomiques (SME 1,2 et 3 ; NMCA ; IMI) ou plasmidiques (KPC ; GES).

Les carbapénémases de classe A sont décrites au milieu des années 1980 ; ont tout d'abord été rapporté chez des entérobactéries nosocomiales (**T.Naas et al 2008**) :

\*SME : fut identifié en 1982 en ANGLETERRE chez deux souches de *S.marcessus* ; puis les enzymes SME-2 ; SME-3 ont été rapporté de façon sporadique aux Etats Unis (**AM.Quennan 2007**) ; tandis que IMI et NMC-A ont été identifiées au niveau de rares isolats cliniques d'*E. cloacae* en ARGENTINE et en France. (**S.Polumarty et al 2003**)

\*GSE ont été identifiés dans le monde entier de façon sporadique ou de petites épidémies chez *E coli*, *E. cloacae*.

Les carbapénémases de classe A les plus fréquentes et les plus menaçantes sont les carbapénémase de type KPC (KPC-2 à KPC-8), la 1<sup>er</sup> souche exprimant KPC-2 fut identifiée dans une souche de *K.pneumoniae* en 1996 en Caroline du Nord des Etats Unis, KPC 2 hydrolyse toutes les B-lactamines ; son activité est partiellement inhibé par Ac.clavulanique ou tazobactam. En absence de mécanisme de résistance associée, elle confère des degrés variables de résistance aux carbapénèmes. Les souches KPC apparaissent souvent plus résistantes aux B-lactamines.

- **Les carbapénémases de classe B :**

Carbapénémases de classe B ou métallo-bêtalactamases (MBL), sont des métallo-enzymes qui contiennent des ions zinc dans leur site actif. Ces enzymes hydrolysent fortement toutes les bêtalactamines à l'exception de l'Aztréonam. Leur activité n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam. Les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont assez variables.

Les gènes de ces MBLs sont, le plus souvent, plasmidiques et associés au sein d'intégrons et de transposons. structures qui assurent la mobilité de ces gènes de résistance et la multirésistance aux antibiotiques.

Dans de nombreux cas, les souches productrices de MBL produisent aussi des BLSEs . Les premières MBL avaient été identifiées dans des espèces d'entérobactéries typiquement hospitalières (*Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) au JAPAN en 1990 (S.Polumarty et al 2003) ,Puis d'autres MBL ont été isolées chez d'autres entérobactéries, dans le monde entier .Il s'agit des nombreuses variétés de bêtalactamases de type IMP et VIM, German imipenemase(GIM-1),et New Delhi Metallo-B-lactamase(NDM-1 ).(T.Naas et al 2003)

- **Carbapénèmases de classe D :**

Carbapénèmases de classe D ou oxacillinases OXA ; sont des sérines protéases hydrolysent les carbapénèmes en absence d' autre mécanisme de résistance (BLSE ; perte de porines ;....), elles n'entraînent qu' une légère diminution de sensibilité; elles ne sont pas inhibée par l' acide clavulanique ou le tazobactam.(L.Poirel et al 2004)

Les gènes qui codent pour ces enzymes ont été isolé sur des structures génétiques mobiles (transposons-plasmide).

La première carbapénèmase de type OXA a été décrite en 1993 ; dans une souche d'*A.baumannii* multi-résistante .Cette enzyme plasmidique a été renommé OXA-23 après séquençage.

Il existe 9 sous groupe de classe D basés sur l'homologie des séquences protéiques :OXA 51 -OXA24 -OXA58- OXA48 -OXA55 -OXA50 -OXA61 -OXA60-OXA23.(T.Walther et al 2006)

OXA48 décrit pour la 1<sup>er</sup> fois en turquie chez *K.pneumoniae*,elle a pour réservoir naturel les espèces environnementales du genre *Shewanella* , A l'inverse des autres carbapénèmases de type OXA, principalement retrouvées chez *Acinetobacter.sp*, OXA48 n'a été décrite que chez les entérobactéries.

## **II.2.Les méthodes de détection des carbapénèmases :**

Les trois classes de carbapénèmases ( A, B, et D) possèdent chacune des propriétés biochimiques singulières, par conséquent plusieurs approches phénotypiques permettent leur détection,( certaines de ces approches sont spécifiques d'une seule et même classe). D'autre part, il existe des approches moléculaires qui, elles, ne vont pas prendre en compte les caractères biochimiques des enzymes mais la génétique du déterminant de la résistance. (L.Dortet 2014)

## II.2.1. Les méthodes phénotypiques :

### II.2.1.1. Test de Hodge modifié :

#### Principe:

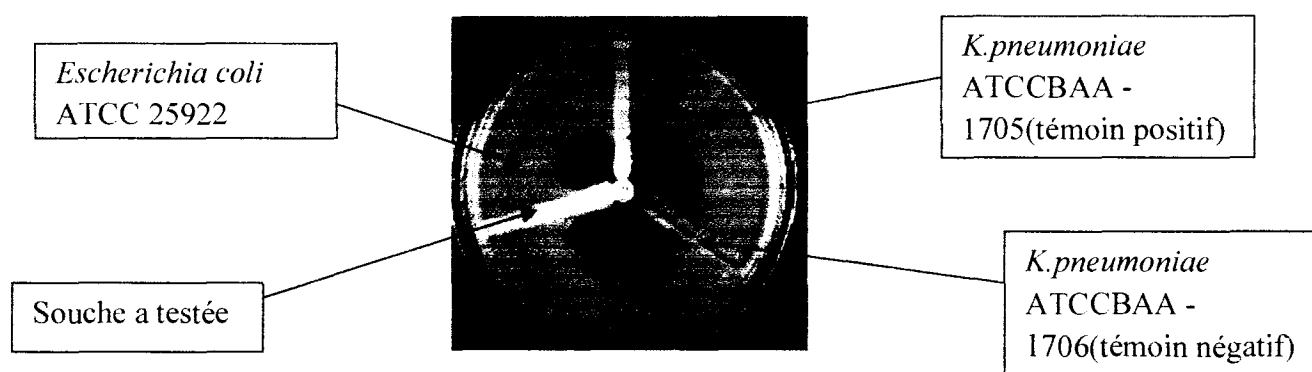
Ce test permet la mise en évidence d'une synergie d'activité enzymatique entre la souche productrice de carbapénémases (souche à tester) et la souche sauvage de référence sensible.

(L.Dortet 2014)

#### La technique :

Le test de Hodge modifié repose sur l'utilisation d'un disque d'ertapénème 10 µg (plus indiqué que imipénème), et la souche de référence sensible *E. coli* ATCC 25922ensemencée par écouvillonnage sur gélose Müller-Hinton à l'aide d'une suspension à 0,5 McFarland diluée au 1/10.

Les souches à tester suspectes de produire une carbapénémase et des souches témoins (témoin positif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 productrice de carbapénémase KP-2 et témoin négatif *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 non productrice de carbapénémase) sont ensemencées en stries depuis le disque vers le bord de la gélose sur une longueur d'au moins 20 mm.



**Figure 1:** Test de Hodge modifié (L.Dortet 2014)

#### Interprétation :

Le test est interprétable en cas de déformation de la zone d'inhibition de la souche de référence le long de la strie de la souche témoin positif. Si une déformation semblable est observée avec la souche test suspecte, celle-ci peut-être considérée comme productrice d'une carbapénémase.

#### Avantages :

- Peu coûteux .
- Bonne détection des souches productrices de carbapénémases de type OXA- 48 et KPC.

Inconvénients :

- Le test de Hodge peut parfois être faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénémases de type NDM-1.
- Le test de Hodge peut parfois être faussement positif pour les souches ayant un défaut d'accumulation des carbapénèmes associé à la production de céphalosporinases et/ou de BLSE.
- Nécessite un délai de 24 h à 48 h, incompatible avec une identification rapide des carbapénémases . (L. Dortet et al 2014)
- Le test ne permet pas de donner une orientation sur la classe des carbapénémase .

**III.2.1.2. Tests d'inhibition :**

Des études d'inhibition peuvent être effectuées en milieu de culture liquide ou solide avec des molécules qui inhibent l'activité des carbapénémases.

Ces tests d'inhibition reposent sur la diminution de la CMI de carbapénèmes en présence d'inhibiteurs spécifiques ou l'augmentation du diamètre d'inhibition autour d'un disque combinant un carbapénème et un inhibiteur, ou encore sur une image de synergie entre un disque de carbapénème et un disque contenant un inhibiteur.

- **Inhibition par l'EDTA :**

- *Bandelettes combinées E-test®*

Principe :

La bandelette E-test® combinée (E-test® MBL, bio Mérieux), comprenant un gradient de Concentration d'un carbapénème avec et sans EDTA, est une des méthodes préconisées pour la mise en évidence des métallo- $\beta$ -lactamases (MBL).

Cette technique utilise l'imipénème et l'association imipénème / EDTA de chaque côté de la bandelette. L'EDTA contenu d'un côté de la bandelette inhibe les enzymes de classe B (MBL) en chélatant les ions métalliques.

Interprétation :

Si après incubation, le ratio entre la CMI avec l'inhibiteur et la CMI sans l'inhibiteur est supérieur ou égal à 8, la souche est considérée comme productrice de MBL.

- *Tests d'inhibition avec disques sur milieu gélosé*

Principe :

Il existe des disques combinés (disques MBL BioRad®) qui permettent de mettre en évidence les MBL, comme précédemment avec les E-tests® combinés, en utilisant l'EDTA comme inhibiteur (C.G.Giske et al. 2011, P.Nordmann et al. 2011, C.Seah et al. 2001)

Interprétation :

La souche est considérée comme productrice de MBL si on observe une augmentation du diamètre d'inhibition du disque avec inhibiteur par rapport à l'autre contenant le carbapénème seul.

La production de carbapénémase de classe B peut également être suspectée si une image de synergie est observée entre un disque d'EDTA et un disque d'imipénème placés sur une gélose l'un en face de l'autre.

R ! Il est préconisé de mettre les deux disques a une distance (centre à centre) inférieure à 3cm. (K.Lee et al 2001, V.Miriagou et al. 2010, M.Vading et al. 2010)

Avantage :

- Cette méthode est efficace pour la détection de souches productrices de MBL présentant une forte résistance.

Inconvénients :

- Cette méthode peut échouer quant à la détection de souches produisant une MBL présentant un bas niveau de résistance à l'imipénème (de faux négatifs ont été rapportés pour des souches ayant une CMI de l'imipénème supérieures ou égales à 4 mg/L) (P.Nordmann et al 2011)

- L'EDTA peut avoir une activité antibactérienne intrinsèque chez certaines souches (en augmentant la perméabilité de la membrane externe) et ainsi être à l'origine de faux positifs ou gêner la lecture du test. (L.Dortet et al 2014)

- **Autres inhibiteurs**

- Il existe d'autres tests phénotypiques qui sont basés sur les propriétés inhibitrices de l'acide boronique vis-à-vis des carbapénémases de type KPC, de l'acide dipicolinique vis-à-vis des métallo- $\beta$ -lactamases et de la cloxacilline vis-à-vis des céphalosporinase (AmpC). (P.Nordmann et al 2012)

**II.2.1.3. Test de Rosco :**Principe:

Récemment, des disques utilisant le méropénème combiné à différents inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases ont été commercialisés afin de permettre la détection et l'identification du mécanisme de la résistance aux carbapénèmes.

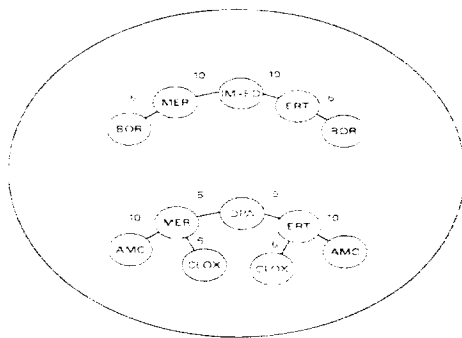
En particulier, ces disques permettent de distinguer la production de carbapénémases de la présence d'une céphalosporinase de haut niveau ou de BLSE couplée à une modification des porines.



Technique :

les disques KPC/MBL® (Rosco Diagnostica) sont déposés sur une gélose Mueller Hinton a ensemencée en avec une suspension de 0.5 Mc Farland de la souche à tester.

Ces disques contiennent respectivement du méropénème, du méropénème couplé à de l'acide dipicolinique (DPA, inhibiteur des enzymes de classe B), du méropénème couplé à de l'acide aminophénylboronique (ABPA, inhibiteur des enzymes de classe A) et du méropénème couplé à de la cloxacilline (inhibiteur des céphalosporinases hyperproduites). ( **Adeline BOUTET-DUBOIS et al 2012**)



•IM+ED	Imipénème+EDTA
•MER	Meropénème
•ERT	Ertapénème
•DPA	Ac.dipicolinique
•AMC	Amoxicilline+Clav.
•CLOX	Cloxacilline
BOR	Ac.Boronique

**Figure 2 :** Test de Rosco (K.Rahal et al 2011)

**R !** Les chiffres représentent la distance entre deux disques en mm

Interprétation : D'après les recommandations du fabricant, une différence  $\geq 5$  mm entre le disque combiné et le disque chargé avec uniquement le méropénème est considérée comme positive.

La synergie observée entre le méropénème et l'ABPA ainsi que le méropénème et la cloxacilline a été détectée chez des souches cumulant une perte de porines à une hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique alors que la synergie entre le méropénème et l'ABPA uniquement a été mise en évidence chez des souches productrices de carbapénémases de classe A.

De même, le DPA a démontré d'excellentes sensibilité et spécificité pour la détection des enzymes de classe B.

Avantages :

- Kits commerciaux (ex : KPC, MBL & OXA-48 confirm kit, ROSCO).

Inconvénients :

- Quelques faux positifs : essentiellement *Enterobacter spp* sur exprimant leur céphalosporinase naturelle qui peut être inhibée par l'acide boronique.
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC possédant de bas niveaux de résistance au méropénème .
- Difficultés d'interprétation pour certaines souches d'EPC produisant des carbapénémases de différents types (ex : NDM + OXA-48-like, KPC + VIM).
- Nécessite un délai additionnel de 24 h à 48 h après obtention de l'antibiogramme incompatible avec l'identification rapide de carbapénémases . (L. Dortet et al 2014)

**II.2.2.Méthodes génotypiques (moléculaires) :**Principe :

Ces techniques reposent sur l'utilisation de la PCR (polymerase chain reaction) , c'est la technique de référence (utilise des couples d'amorces spécifiques aux différents groupes de gènes de carbapénémases) ou sur des techniques d'amplification/hybridation sur puces.

Ces techniques peuvent être complétée par le séquençage de l'ADN amplifié (utile uniquement à des fins épidémiologiques).

Il est possible de rechercher chaque gène de carbapénémase de manière spécifique (utile dans un contexte d'épidémie, ou bien lorsqu'on sait qu'un seul type de carbapénémase est présent dans la zone géographique), ou bien d'utiliser un système multiplex incluant plusieurs paires d'amorces et permettant dans ce cas de rechercher en une seule réaction plusieurs de ces gènes cibles.

A partir d'une colonie suspecte des kits de détection des gènes de carbapénémases basés sur l'utilisation de puces à ADN (ex : Check-MDR CT103 kit, Check-Points) sont également disponibles sur le marché. Ces derniers sont encore plus onéreux, nécessitent un appareil dédié, et demandent une certaine expertise, mais cette méthode est la méthode de référence et de confirmation pour la détection des EPC .

Avantages :

- Permet la détection simultanée de carbapénémase de type KPC ,OXA 48 ,VIM,IMP ,NDM-1
- Sensibilité et spécificité de 100% pour la détection des gènes bla-VIM,bla-IMP,bla-NDM,et bla-OXA 48.
- Permet d'obtenir un résultat rapide (environ 6 h) .

Inconvénients :

- Inaccessible pour la plupart des laboratoires de microbiologie .
- Incapacités de détecter de nouvelle carbapénémase .(L. Dortet et al 2014)

Les techniques de détection des différents types de carbapénémases sont résumées dans le tableau ci-dessous :

**Tableau III:** Méthodes de détection des carbapénémases chez les entérobactéries (original)

Mécanisme de résistance / Test	Carbapénémase de classe A	Carbapénémase de classe B	Carbapénémase de classe D	céphalosporinases hyperproduites + imperméabilité
Test de Hodge modifié	++	++	++	-
Test à EDTA	-	++	-	-
Test à l'acide boronique	++	-	-	-
Test à cloxacilline	-	-	-	++
Synergie entre AMC et IMP/ERT	++	-	-	-
Test de Rosco	+	+	+	+
PCR	+++	+++	+++	+++

+++ : Méthode de référence .

++ : Méthode utile et spécifique pour la détection .

+ : Méthode utile mais non spécifique pour la détection .

- : Méthode inutile pour la détection .

AMC : amoxicilline + acide clavulanique .

ERT : ertapénème

IMP : imipénème .

# Chapitre III

## CHAPITRE III : EPIDEMIOLOGIE

### III.1.Portage:

Le portage (ou la colonisation) des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (ERC) est digestif, il est cliniquement inapparent et seul le dépistage permet de l'identifier. En revanche, les deux populations colonisées et infectées sont des sources de contamination. (P.Bailly et al 2001)

### III.2.Mode de transmission :

La transmission des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes se fait soit par voie directe (voie oro-fécale où la transmission est facilitée par la diarrhée et l'incontinence fécale) ou indirecte (par les mains, le matériel et l'environnement). (F.Raymand 2008)

Le risque de transmission est majoré à l'hôpital :

- dans les services où la charge en soins est importante.
- dans les services où les patients pris en charge présentent des facteurs de risque qui les rendent susceptibles d'être colonisés par ces bactéries. Ces facteurs de risque sont :

\*Patients ayant séjourné dans un établissement de santé dans un pays où la prévalence de résistance est importante.

\*Patients « contacts », c'est-à-dire les patients qui sont pris en charge par la même équipe soignante qu'un patient chez lequel ce type de bactérie a été identifié soit dans un prélèvement clinique soit dans un prélèvement de dépistage.

\* Patients ré-hospitalisés ayant dans leurs antécédents la notion d'une colonisation/infection Par ces bactéries. (P.Bailly et al 2001)

### III.3.Donnés épidémiologiques :

- Dans le monde :

Les carbapénémases de classe A, seules celles de type KPC ont été très largement rapportées dans le monde. Les carbapénémases KPC ont été identifiées essentiellement chez *K.pneumoniae* (G.Cuzon et al 2011). Après leur identification sur la côte Est des Etats-Unis, en Caroline du Nord en 1996, d'autres souches d'entérobactéries productrices d'enzymes de type KPC ont été très rapportées dans la plupart des états des Etats-Unis (P.Nordmann et al 2010) . Puis, ces souches ont été très décrites en Israël et en Grèce où elles semblent être maintenant endémiques. Elles ont été rapportées également dans la plupart des pays européens de façon sporadique, au Canada, en Amérique du Sud, dans les Caraïbes et en Chine (G.Cuzon et al 2010).

Les carbapénèmases de classe B (VIM, IMP...) ont été également décrites dans le monde entier avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. Leur hôte le plus habituel est *K. pneumoniae*. Initialement retrouvées dans une souche d'*E. Coli* en Grèce (VIM-1), ces métallo enzymes sont apparus rapidement dans des isolats de *K. pneumoniae* et d'autres entérobactéries sont devenues endémiques en Grèce et dans d'autres pays d'Europe (I.Hellere 2011). Plusieurs épidémies de souches d'entérobactéries produisant ces carbapénèmases ont été identifiées, notamment au Japon, en Italie, en Espagne et en Grèce.

NDM-1 est l'une des métallo- $\beta$ -lactamases les plus récemment isolées. Elle a eu, très vite après sa découverte chez un patient d'origine suédoise hospitalisé à New-Delhi en 2008

(P.Hsueh et al 2010), une diffusion internationale importante identifiée dès 2010 au moins en Inde, au Pakistan et en Grande-Bretagne chez *K. pneumoniae* et *E. coli* en milieu hospitalier et également en milieu communautaire. (P.Nordmann et al 2010)

Carbapénèmases de classe D ont émergé en Turquie à partir d'une souche de *K. pneumoniae* (KP 11978) puis diffusés dans d'autres pays méditerranéen. (R.Canton et al 2012)

- Il a été suggéré récemment que la dissémination des entérobactéries productrices de carbapénèmases (EPC) était dominée en milieu hospitalier par des souches de *K. pneumoniae* pouvant produire tous les types de carbapénèmases (principalement KPC.VIM, NDM et OXA-48) et en milieu communautaire par des souches d'*E. coli* produisant les enzymes NDM ou celles de classe D (OXA-48 et OXA-181) (R.Canton et al 2012, V.Dimou et al 2012, P.Nordmann et al 2011).

- En Europe :

Les cas de KPC décrits restent rares, souvent sporadiques et importés. En France, sept souches ont été décrites : une première *K. pneumoniae* KPC-2 isolée en 2005 chez un patient ayant séjourné dans un hôpital new-York (T.Nass, P.Nordman 2005), trois souches de *Enterobacter cloacae* porteuses de KPC-3 on également été isolées chez un patient hospitalisé précédemment en unité de soins intensifs d'un hôpital de New-York (L.Dortel et al 2008) une souche de *Escherichia coli* et une souche de *Enterobacter cloacae* isolées chez un homme précédemment hospitalisé en Israël. (S.petrella et al 2008)

De même, la première souche de *K. pneumoniae* KPC-2 isolée en Suède provenait d'un patient ayant séjourné en Grèce (R.Tegmark et al 2007), seul pays Européen où des épidémies, toujours de *K. pneumoniae* KPC-2, ont été décrites et où la situation semble devenir endémique. (S.Pournaras et al 2009)

Enfin, plusieurs souches ont été décrites au Royaume-Uni (*Enterobacter spp. K. pneumoniae* KPC-4 et *K. pneumoniae* KPC-3). Pour certaines de ces souches, un lien direct avec l'Israël a pu être établi. (N.Woodford et al 2008).

- **En Afrique :**

Les carbapénèmes les plus répandues sont les OXA-48(carbapénèmes de type D) avec sa diffusion chez *K.pneumoniae* dans de nombreux hôpitaux de plusieurs pays d'Afrique (Egypt, Afrique du sud ,Sénégal , Afrique de nord) (A.Benouda et al 2010) ; d'autres types de carbapénèmes ont été isolés, carbapénèmes de type A (GES l' Afrique du sud ) et carbapénèmes de type B (NDM au Cameroun) .

- **Au Maghreb :**

La première OXA-48 isolée en France a été identifiée en 2009 à Paris à partir d'une souche de *K.pneumoniae* d'un patient venant de Tunisie (R.Canton et al 2012, G.Cuzon et al 2011). Depuis, des épidémies ont été décrites à différents endroits du globe incluant notamment (Maroc , Lybie) (A.Benouda et al 2010). Autre carbapénémase de type KPC ont été isolés en Tunisie en 2011.

- **En Algérie :**

Les taux de résistance des entérobactéries vis à vis de l'imipénème des années allant de 2009 à 2011 selon le réseau Algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (AARN) , sont présentés dans le tableau ci- dessous :

**Tableau IV:** Nombre et pourcentage d'entérobactéries (R + I) à l'imipénème entre 2009 et 2011 en Algérie . (ARNN)

Année	n	N	Taux de résistance %	Entérobactéries les plus touchés
2009	8	7622	0.10	<i>Proteus mirabilis</i>
2010	22	9279	0.23	<i>Enterobacter sp</i>
2011	3	7857	0.038	<i>Proteus sp.</i>

**N** : nombre total d'entérobactéries isolées .

**n** : nombre d'entérobactérie résistantes à l'imipénème.

Pour ce qui est de type de carbapénémase retrouvées en Algérie peu d'études sont réalisées.

La carbapénémase de type OXA-48 a été retrouvée pour la première fois en Algérie en 2010 chez une souche de *K.pneumoniae*. (N. Aggoune et al<sub>1</sub> 2014)

Depuis, nous assistons à l'émergence de ce type d'enzymes au sein de différentes structures hospitalières du pays. Durant la période allant de Septembre 2011 à Avril 2014, les 17 souches d'entérobactéries de sensibilité diminuée aux carbapénèmes collectées ont été des carbapénémases de type OXA-48. Deux souches de *K.pneumoniae* OXA -48 associent une carbapénémase de type NDM. (N. Aggoune et al<sub>2</sub> 2014)

Cette étude met en évidence la large présence d'OXA-48 dans les hôpitaux algériens. Elle signale également l'apparition de la carbapénémase de type NDM.



# Chapitre IV

## Traitement et prévention

## CHAPITRE IV : TRAITEMENT ET PREVENTION

### IV.1. Traitement:

#### IV.1.1. Les règles d'utilisation des carbapénèmes:

Les carbapénèmes sont des molécules indispensables pour le traitement des infections à germes producteurs de BLSE, surtout dans le contexte actuel de diffusion massive des BLSE de type CTX-M.

Les carbapénèmes sont des molécules précieuses dont il convient absolument de préserver l'efficacité. Ce d'autant qu'il n'existe actuellement pas de perspective proche de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques. En pratique cela implique que leur emploi doit obéir à quatre règles qui s'inscrivent dans le cadre général du bon usage des antibiotiques :

- les carbapénèmes ne devraient être prescrits qu'en situation de risque d'infection à bacilles à Gram négatif résistants tels que *P.aeruginosa* (hors ertapénème) ou les entérobactéries BLSE ou du groupe III ;
- une réévaluation du traitement au 2<sup>ème</sup>-3<sup>ème</sup> jour : une désescalade pour une molécule de spectre plus étroit doit être réalisée ou du moins discutée ;
- Une durée de traitement la plus courte possible : plusieurs études ayant montré une relation entre la durée de traitement et le risque d'émergence de souches résistantes, notamment pour les carbapénèmes.
- Des posologies suffisantes, en particulier à la phase initiale de l'infection au cours de laquelle l'inoculum est le plus élevé. (M. Wolffer al 2009)

#### IV.1.2. Traitement des infections à entérobactéries résistantes aux carbapénèmes :

##### IV.1.2.1. Traitement actuel:

La plupart des souches d'entérobactéries produisant une carbapénémase ont un phénotype de multirésistance aux antibiotiques qui limite très fortement les possibilités thérapeutiques, que ce soit dans le milieu hospitalier ou dans le milieu communautaire.

Cette multirésistance est, en partie, due à l'association fréquente de la carbapénémase à une BLSE, comme c'est souvent le cas pour OXA-48. Elle peut aussi être la conséquence d'une association à d'autres mécanismes de résistance, comme par exemple une altération des porines. Quand les deux possibilités sont associées, les souches peuvent alors être pan-résistantes et confrontent les cliniciens à une impasse thérapeutique. (N. Grall et al 2011)

En pratique, les possibilités thérapeutiques face aux souches productrices de carbapénémases se limitent souvent, au mieux, à certains aminosides, à la tigécycline, à la colistine, à la

fosfomycine voire à certaines quinolones ( **M.E.Falagas et al 2011**, **I.Heller et al 2011**, **M.Kaase et al 2011**)

Les CMI( Concentration Minimale Inhibitrice) des carbapénèmes pour les souches productrices de carbapénèmases sont assez variables d'une molécule de carbapénème à l'autre. Cette variabilité des niveaux de résistance a suggéré l'utilisation possible de certains carbapénèmes, lorsque la CMI est faible, dans le traitement d'infections dues à de telles souches (**D.Gary et al 2010**).

Par exemple, dans les cas où les souches exprimant OXA-48 ne possèdent pas également de BLSE, les niveaux de résistance aux carbapénèmes sont bas ce qui peut faire envisager leur utilisation (**C.Kosmidis et al 2012**) voire l'utilisation de céphalosporines à large spectre seules (**L.Poirel et al 2012**) ou associées à d'autres antibiotiques : céfotaxime et amikacine par exemple ( **M.Levast et al 2011**), puisque les C3G peuvent être sensibles dans ces cas .

#### **IV.1.2.2.Perspectives:**

Le risque d'impasse thérapeutique est réel, cela d'autant plus qu'il n'existe pas de perspectives proches de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif, et en particulier sur les EPC ( **V.Cattoir et al 2009** ) d'où la nécessité à développer de nouveaux traitements .

En réalité, le développement de ces nouvelles molécules n'est pas aussi simple. Cela est dû à plusieurs raisons d'une part, la facilité qu'ont ces bactéries à s'échanger leurs gènes de résistance aux antibiotiques et d'autre part, la nécessité pour les antibiotiques de traverser la membrane externe de ces bactéries à Gram négatif pour arriver sur le lieu de leur action. De plus, le développement de nouveaux antibiotiques basé sur la biologie, tels que la thérapie par les phages ou même les ARN anti-sens, paraît peu probable. En effet, la plasticité génétique des bactéries va limiter tout développement dans ce domaine .( **P.Nordmann et al 2012**) Seules des molécules traditionnellement synthétisées selon la base chimique pourraient ouvrir de nouvelles voies pour l'antibiothérapie. Ces nouvelles molécules peuvent résulter, par exemple, de l'identification de nouvelles cibles dans le métabolisme bactérien, ou encore de l'analyse de molécules pouvant interagir avec le site actif des carbapénèmases. A titre d'exemple, NXL104 (Novoxel :est un nouvel inhibiteur de  $\beta$ -lactamases), et contrairement aux inhibiteurs classiques (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam), il n'appartient pas à la famille des  $\beta$ -lactamines. Son spectre d'inhibition est large, comprenant les  $\beta$ -lactamases de classe A (pénicillinasés,  $\beta$ -lactamases à spectre étendu BLSE et certaines carbapénèmases) et les céphalosporinasés de la classe C. Peut inhiber l'activité de carbapénèmases de classe A

(incluant celles de type KPC) et de carbapénèmases de classe D. (V.Cattoir et al 2011, D.M.Livermore et al 2011)

Le nouvel inhibiteur NXL104, associé à une céphalosporine ou à un carbapénème, aurait une bonne efficacité dans le traitement d'infections à entérobactéries productrices de KPC ou d'OXA-48 plus ou moins associées à une production de BLSE comme CTX-M (D.M.Livermore et al 2008). Des associations avec la ceftazidime ou l'aztréonam (D.M.Livermore et al 2011) ou encore avec la ceftaroline sont aussi à l'étude. (S.Mushtaq et al 2010)

Le BAL30376, composé complexe associant monobactames et l'acide clavulanique peut également être une source d'espoir pour le traitement de patients infectés par de telles souches. (M.E.Falagas et al. 2011 , D.M.Livermore et al. 2010)

#### **IV.2. Mésures préventives :**

La stratégie de prévention repose sur la mise en place d'une politique globale de contrôle des bactéries multi-résistantes à transmission oro-fécale:

##### **IV.2.1. Isolement de contact :**

c'est l'isolement de patients suspectés ou porteurs d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes dans une chambre individuelle .

Aucune donnée n'est disponible sur la durée de portage d'une entérobactérie productrice d'une carbapénémase. Il est donc prudent de maintenir les précautions contre la transmission par contact pendant toute la durée de l'hospitalisation. Lors d'un séjour prolongé, l'équipe de prévention des infections pourrait envisager de mettre fin à l'isolement si plusieurs résultats de dépistage, réalisés une semaine ou plus suivant l'arrêt de tout antibiotique .topique ou systémique, sont négatifs.

Ses précautions contre la transmission par contact doivent être appliquées :

-En attendant les résultats de dépistage d'un patient admis directement en provenance d'un milieu de soins qui a connu une éclosion ou bien d'un milieu où la prévalence de résistance est importante.

-Pour tout patient colonisé ou infecté avec une entérobactérie productrice de carbapénèmases;

- Pour les contacts étroits (patient ayant séjourné pendant 24 heures ou plus dans la même chambre qu'un porteur alors que des précautions contre la transmission par contact n'étaient pas appliquées). (M.Hity et al 2012)

#### IV.2.2. Le dépistage :

La prévention de la propagation des souches productrices de carbapénèmases repose sur la détection précoce et précise des porteurs à l'admission et à la sortie de l'hôpital.

Le dépistage permet :

- D'identifier les patients colonisés et chez lesquels les bactéries du tube digestif pourraient traverser la barrière intestinale et aller se greffer sur un dispositif médical qui serait la porte d'entrée d'une infection.

- Le suivi de la situation épidémiologique et s'assurer de l'absence de nouveaux cas et de rappeler aux soignants les mesures barrières de prévention pour éviter toute diffusion de ces bactéries.

La question principale reste de savoir qui doit se faire dépister. Plusieurs pays ont introduit des recommandations, mais elles diffèrent considérablement. Le dépistage devrait inclure au moins :

- Les patients « à risque » c'est-à-dire ceux venant des soins intensifs ou de transplantation et les sujets immunodéprimés.

- Patient est confirmé comme étant infecté ou colonisé par une souche productrice de carbapénèmase (le programme de dépistage devrait être étendu aux patients du même service).

- Les patients ayant été au contact d'un patient infecté /colonisé connu. **(C.Fankhanser 2009)**

#### IV.2.3. Décolonisation ou Chimio décontamination des porteurs :

La décolonisation est l'administration locale, au niveau des sites réservoirs, d'antibiotiques non absorbables, aux patients colonisés et/ou infectés. **(M.Buehlmann et al 2011)**

Pour les entérobactéries productrices de carbapénèmases, la décolonisation est digestive et repose sur l'utilisation d'antibiotiques non absorbables par la muqueuse digestive, atteignant des concentrations intraluminales élevées. Les antibiotiques le plus souvent administrés sont la gentamicine, la colimycine et l'érythromycine base (non absorbée par le tube digestif, à la différence des sels d'érythromycine). Une association de deux molécules est souvent utilisée. Cette décolonisation est poursuivie pendant toute la durée de l'hospitalisation du patient ou au moins jusqu'au troisième écouvillonnage rectal négatif. **(M.Buehlmann et al 2013)**

Compte tenu de l'hétérogénéité de ces études, testant divers régimes de décolonisation dans des contextes épidémiologiques différents, de la variabilité des taux de décolonisation achevés, de la difficulté d'obtenir une décolonisation digestive à long terme et du risque d'émergence de résistance, la décolonisation digestive doit encore être considérée comme

expérimentale et aucune recommandation ne peut être faite quant à l'utilité, aux indications, et au choix d'un régime de décolonisation. (T.Halaby et al 2013)

**IV.2.4.L'information :**

-Information du patient et de ses proches .

- information appropriée des professionnels soignants, et des transporteurs lors des transferts internes ou externes du patient.

- Information de l'établissement de transfert du portage ou de l'infection par une entérobactérie résistante aux carbapénèmes. (P.F.Andreas Tietz et al 2011)

**IV.2.5.Lutte pour un usage raisonné des antibiotiques :**

L'utilisation rationnelle et raisonnée des antibiotiques est plus que jamais un challenge pour tenter de maîtriser l'émergence des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques.

(C.Laurent et al 2008)

**IV.2.6.Lutte contre le péril fécal :**

L'hygiène des mains, la gestion des excréta et le bio nettoyage sont les points critiques.

La promotion des bonnes pratiques en hygiène, le respect des précautions standard et des précautions complémentaires sont donc les mesures barrières attendues pour maîtriser la diffusion des bactéries hautement résistantes aux antibiotiques. (C.Laurent et al 2008)

**IV.2.7.La surveillance :**

La surveillance épidémiologique ,permet le suivi de la situation épidémiologique locale et régionale.

Les milieux de soins doivent mettre en place une surveillance prospective des cas afin de connaître l'incidence locale des porteurs, de repérer les cas et les éclosions, et de s'assurer de l'efficacité des mesures de prévention et de contrôle.

Une évaluation rétrospective (six à douze mois) des résultats de laboratoires pour repérer des cas qui auraient pu être hospitalisés sans mesures de prévention et contrôle appropriées peut être envisagée dans certains milieux. (S.Demir et al 2008)

Partie  
pratique

# Chapitre V

## Matériels et méthodes

---



## CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES

### V.1. Protocole et durée de travail :

Notre étude a eu lieu au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida-unité Frantz Fanon, portant sur l'ensemble des entérobactéries isolées des différents de prélèvements; elle s'est répartie en deux volets :

- ❖ Une étude rétrospective étalée sur une période de trois années, allant de Janvier 2012 à Décembre 2014.
- ❖ Une étude prospective ayant duré 04 mois, de Janvier 2015 à Avril 2015.

### V.2. Matériels:

#### V.2.1. Appareillage : (Annexe I)

Étuve, autoclave, microscope optique, bec bunsen, séchoir, hotte, réfrigérateur.

#### V.2.2. Matériels non biologiques :(Annexe I)

Représenté par : les milieux de culture, la verrerie, les lames, cellule de Nageotte, seringues, eau physiologique, disques d'antibiotiques, galeries d'identification, et les réactifs.

#### V.2.3. Matériels biologiques :

Représenté par :

- Les entérobactéries isolées de différents types de prélèvements avec un diamètre d'inhibition pour méropénème et imipénème < 22mm et pour ertapénème < 21mm.
- Les souches de référence (ATCC) : ces souches sont utilisées pour valider les différents tests effectués, les souches de références du laboratoire sont fournies par l'institut Pasteur d'Algérie, la souche de référence utilisée est *Escherichia coli* ATCC25922.

### V.3. Méthodes : étude bactériologique

L'isolement et l'identification des entérobactéries ont été réalisés par les techniques conventionnelles :

#### V.3.1. Examen microscopique :

##### V.3.1.1. Examen à l'état frais :

###### Principe :

Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur morphologie, de leur mode de groupement et de leur mobilité éventuelle.

###### Technique :

-Prendre une lame propre nettoyée avec du coton imbibé d'alcool à 95°, on a deux cas à distinguer

-Cas d'une culture sur milieu liquide on dépose sur une lame une goutte de cette culture, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

-Cas d'une culture sur milieu solide. On dépose tout d'abord sur la lame une goutte de l'eau physiologique stérile, puis un fragment bactérien.

-Recouvrir d'une lamelle ; puis observer au microscope optique ( $G \times 40$ ).

Cette méthode permet d'identifier : la forme, la mobilité et le mode de groupement des bactéries.

### V.3.1.2. Examen après coloration :

Complément indispensable de l'examen à l'état frais ; il permet de mieux apprécier la morphologie des bactéries, fournit aussi éventuellement des renseignements complémentaires sur leur structure.

#### Coloration de Gram :

C'est la coloration de référence en bactériologie. Cette technique permet de distinguer les bactéries : les Gram positif et les Gram négatif, ce qui est d'un grand intérêt diagnostique.

#### Mode opératoire :

Elle est réalisée selon les étapes suivantes :

- Préparation du frottis :
  - Déposer une goutte d'eau sur une lame.
  - Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.
  - Dissocier soigneusement le fragment de colonie dans la goutte d'eau.
  - Sécher rapidement en passant la préparation au-dessus de la flamme d'un bec

Bunsen.

- Coloration par le violet de gentiane . Laisse agir pendant une minute.
- Mordançage au lugol (solution d'iode-iodurée) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincer à l'eau déminéralisée.
- Décoloration (rapide) à l'alcool : verse goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rince abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
- Recoloration à la fuchsine diluée. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute.
- Laver doucement à l'eau déminéralisée. Séchez la lame .
- Observez avec une goutte d'huile à immersion à l'objectif  $\times 100$  (grossissement  $\times 1000$ ).

Lecture :

- Les bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet.
- Les bactéries à Gram négatif sont colorées en rose.



**Figure 3:** Lecture de la coloration du Gram (*Escherichia coli*)  
([www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net))

**V.3.2. Isolement :** (Annexe II)

Se fait sur divers milieux de culture : milieu de base (gélose nutritive) et/ou sur milieu sélectif (BCP, Mac-conkey).

Les colonies des entérobactéries présentent divers aspect selon le milieu d'isolement :

**Sur GN :**

Les colonies ont un diamètre de 1.5 à 3 mm. elles sont généralement rondes, lisses, à contour régulier.elles peuvent être mucoïdes larges et luisantes (*Klebsiella pneumoniae*).



*Klebsiella*

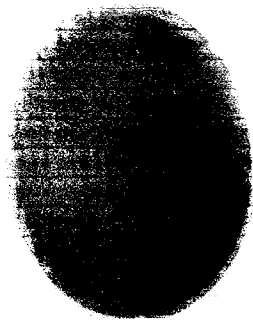


*E. coli*

**Figure 4:** Aspect des colonies des entérobactéries sur GN (Originale)

**Sur BCP :**

- Colonies de 1-2 mm de diamètre ; de couleur jaune (lactose+) : *E. coli*.
- Colonies de 1-2 mm de diamètre ; de couleur violette (lactose-) : *Morganella.morgannii*.



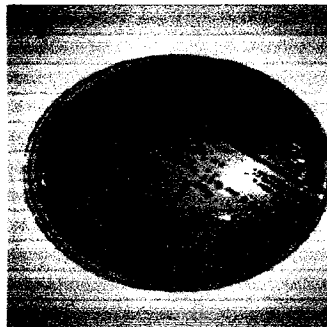
Entérobactéries lactose +



Entérobactéries lactose -

**Figure 5 :** Aspect des colonies des entérobactéries sur BCP (Originale)**Sur Mac-conkey :**

- Colonies de 1-2 mm de diamètre, de couleur rose (lactose saccharose +) : *E. coli*.
- Colonies de 1-2 mm de diamètre, incolores (lactose saccharose -) : *Shigella*.



Entérobactéries lactose/saccharose +



Entérobactéries lactose/saccharose -

**Figure 6 :** Aspect des colonies des entérobactéries sur Mac-conkey .

(Originale)

**V.3.3. Identification biochimique :**

Les caractères d'identification sont essentiellement biochimiques, on utilise des tests qui étudient : le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane), la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz.

Ces caractères sont mis en évidence par des :

- Galerie classique : un ensemble des milieux en tubes qui servira à réaliser ces tests biochimiques ;
- Galerie api 20E : c'est un système miniaturisé pour l'identification des entérobactéries.

## V.3.3.1. Galerie classique : (Annexe II)



Figure 7 : Galerie classique (Originale)

- Test d'oxydase :

Principe :

Ce test permet la détection de l'oxydase ou cytochrome oxydase qui est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoire cytochromiques bactériennes.

La recherche de cette enzyme est essentielle dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif.

Elle permet de différencier les entérobactéries qui sont oxydase négative des autres bacilles à gram négatif oxydatifs qui sont oxydase positive (*Pseudomonas*).

Technique :

- Déposer, sur une lame porte-objet propre, un disque d'oxydase imbibé d'eau physiologique stérile ;
- Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et l'étaler sur le disque.

Lecture :

Le test à la recherche de l'oxydase est positif si une coloration violette foncée apparaît immédiatement sur le disque ou en quelques secondes.



Figure 8 : La lecture de test d'oxydase

- **Recherche de la  $\beta$ -galactosidase (ONPG) :**

Est l'enzyme indispensable, de dégradation du lactose. C'est une méthode simple et rapide qui permet de rechercher directement l'enzyme  $\beta$ -galactosidase .

Principe :

L'orthonitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside est analogue structural du lactose. Ce substrat synthétique incolore peut être scindé en galactose et en orthonitrophénol (composé soluble jaune) en présence d'une des enzymes appelées ONPG-hydrolase.

Technique :

Dans le tube à essai, contenant 0.5 ml de suspension bactérienne dense et pure on ajoute un disque d'ONPG, on ajoute quelques gouttes d'une suspension bactérienne dense et pure.

Incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture :

Réaction positive : coloration jaune.

Réaction négative : absence de coloration.

- **Utilisation de citrate :**

Principe :

Certaines entérobactéries, sont capables d'assimiler le citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie.

Technique :

Ensemencer la pente de ce milieu en stries à partir d'une colonie isolée prélevée sur une gélose nutritive à l'aide d'une pipette pasteur.

Incuber à 37° C pendant 24h.

Lecture :

Lorsque le milieu vire au bleu (modification de pH), la réaction est positive.

- **Mise en évidence de la voie fermentaire:**

Les entérobactéries utilisent deux voies de fermentation :

-Voie des acides mixtes mise en évidence par le test RM (rouge de méthyle) : diminution de PH et les produits obtenus sont l'acide lactique, succinique, acétique et formique.

- Voie de butylène –glycol mise en évidence par la réaction de VP (Voges Proskauer) : de l'acétone est mise en évidence par une coloration rouge obtenu en milieu alcalin par action de la créatinine ou alpha naphthol ou les deux à la fois sur le diacetyl formé.

Technique :

- On ensemence le milieu Clark et Lubs avec la suspension bactérienne à étudier à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ;
- incubé à 37°C pendant 24h

Lecture :

Après incubation, on partage le contenu du tube en deux.

- Dans le 1<sup>er</sup> tube, on ajoute 1 à 2 gouttes de rouge de méthyle. La réaction RM est positive quand la teinte est rouge. Elle est négative lorsque la teinte est jaune.
- Dans l'autre tube on ajoute 0.5 ml de VP1 (soude 4N) puis 0.5 ml de VP2 (solution alcoolique  $\alpha$ -naphthol). On agite et on laisse le tube en position inclinée.

L'apparition d'une coloration rouge cerise signe une réaction VP positive.

La réaction VP est négative quand la coloration reste jaune.

- **Milieu Triple-Sugar-Iron (TSI)**

Principe :

Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères, la fermentation de 3 sucres (glucose, lactose, saccharose), la production du gaz et la formation de sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ).

Technique :

Un milieu TSI est ensemencé par stries sur la pente et par pique centrale dans le culot.

Incuber 37° pendant 24 h.

Lecture :

- Culot jaune : fermentation du glucose (glucose+).
- Culot rouge : glucose -
- Pente jaune : fermentation du saccharose et / ou du lactose (lactose /saccharose+).
- Pente rouge : pas de fermentation du saccharose et du lactose (lactose -, saccharose -).
- Dégagement de gaz (gaz +), pas de bulles d'air (gaz-).
- Noircissement de milieu : production de  $H_2S$  ( $H_2S$  +), pas de noircissement ( $H_2S$ -).

- **Milieu mannitol mobilité :**

C'est un milieu de culture qui permet de déterminer la fermentation du mannitol ainsi que la mobilité de la bactérie à identifier.

L'ensemencement du milieu s'effectue par pique centrale.

Après incubation de 18 à 24h à 37°C, le virage de la couleur du milieu du rouge en jaune indique une fermentation du mannitol. Le développement de la bactérie en voile qui envahit la masse gélosée indique une mobilité positive.

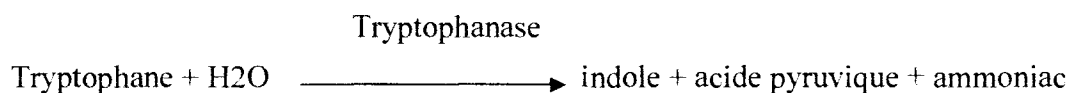
- **Milieu de Ferguson :**

Principe :

Ce milieu qui est appelée milieu urée indole est un milieu synthétique permet de réaliser 3 tests biochimiques qui interviennent dans la différenciation et/ou dans l'identification des entérobactéries : le test uréase, le test TDA et le test indole.

-Uréase : est une enzyme qui hydrolyse l'urée (composé organique riche en azote) en carbonate d'ammonium.

- Le tryptophanase est un complexe multienzymatique, qui permet aux micro-organismes de produire de l'indole à partir du tryptophane, la réaction est lisible après l'addition du réactif de Kovacs.



- Le tryptophane désaminase agit sur le tryptophane en donnant de l'acide pyruvique et de l'ammoniac, la réaction est lisible après addition de réactif de TDA.



Technique :

Prélever un inoculum et l'ensemencer dans le milieu urée-indole.

Incuber à 37°C pendant 24 h.

Lecture :

- Uréase : - Virage d'indicateur du jaune orangé au rouge violacé : réaction (+).

- Absence de virage : réaction (-).

- Indole : On ajoute le réactif de Kovacs (4 à 5 gouttes).

S'il y apparition d'un anneau rouge en surface, la réaction est (+).

L'apparition d'anneau jaune : indole (-).

- TDA : On ajout 7 à 8 gouttes de réactif TDA (perchlorure de fer).

Coloration immédiate du milieu en brun, la réaction est (+).

Coloration jaune clair : réaction (-).

- **Mise en évidence des decarboxylases et de déshydrogénases (ADH, LDC, ODC) :**

Principe :

Ce test détecte la capacité qu'a une bactérie de produire des decarboxylases et des déshydrogénases, enzymes qui dégradent les acides aminés à savoir l'arginine, la lysine et l'ornithine.



Technique :

- Ensemencer à partir d'une suspension bactérienne, des milieux contenant les différents acides aminés (arginine, lysine et ornithine), et un témoin, qui ne contient que du glucose.
- Ajouter quelques gouttes d'huile de vaseline stérile (pour l'anaérobiose).
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Lecture :

Tube témoin : virage au jaune indique la fermentation du glucose et l'acidification du milieu.

Tubes tests :

- Milieu coloré en violet : réaction (+). les bactéries ont acidifié le milieu à partir du glucose. ensuite par décarboxylation de l'acide aminé présent, le milieu est devenu alcalin.
- Milieu jaune : réaction (-).les bactéries ont seulement fermenté le glucose.

**V.3.3.2.Galerie Api 20 E : (Annexe III)**Principe :

La galerie Api 20 E comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés, au-dessous de chaque tube, un signe indique la nature du test.

Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.



**Figure 9:** Galerie API 20E avant ensemencement. (Originale)

Préparation de l'inoculum :

- prélever à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée une colonie parfaitement isolée,
- Dissocier soigneusement la colonie dans une ampoule de « suspension medium » ou dans un tube d'eau distillée stérile de 5 ml.

Ensemencement de la galerie :

- A l'aide d'une pipette munie d'une poire remplir le micro tubes de la galerie :
  - Lorsque le sigle du test est encadré, ce qui est le cas des tests CIT, VP, et GEL, la suspension doit remplir le tube et la cupule.
  - Remplir uniquement les tubes des autres tests.

- Créer une anaérobiose dans les tests ADH, LCD, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant les cupules d'huile de vaseline stérile.

-Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37 °C pendant 18 à 24 heures.

Lecture :

Après incubation, la lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture.

Réaliser les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Identification :

Comparer les réactions notées sur la fiche de résultat avec celle de table d'identification.

Coder l'ensemble des réactions en un profil numérique de 7 chiffres qui nous permet d'identifier avec le catalogue analytique le nom de l'espèce à laquelle est identifiée la bactérie ou avec un logiciel d'identification.



**Figure 10:Galerie API 20E après incubation. (Originale)**

### **V.3.4.Etudes de la sensibilité aux antibiotiques :**

#### **V.3.4.1.Antibiogramme :**

Technique :

La méthode que nous avons utilisée est l'ensemencement par écouvillonnage préconisé par CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) et recommandé par l'OMS.

Milieu:

Gélose Muller-Hinton (MH) (entérobactéries : non exigeantes) coulée en boîte de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

Préparation de l'inoculum:

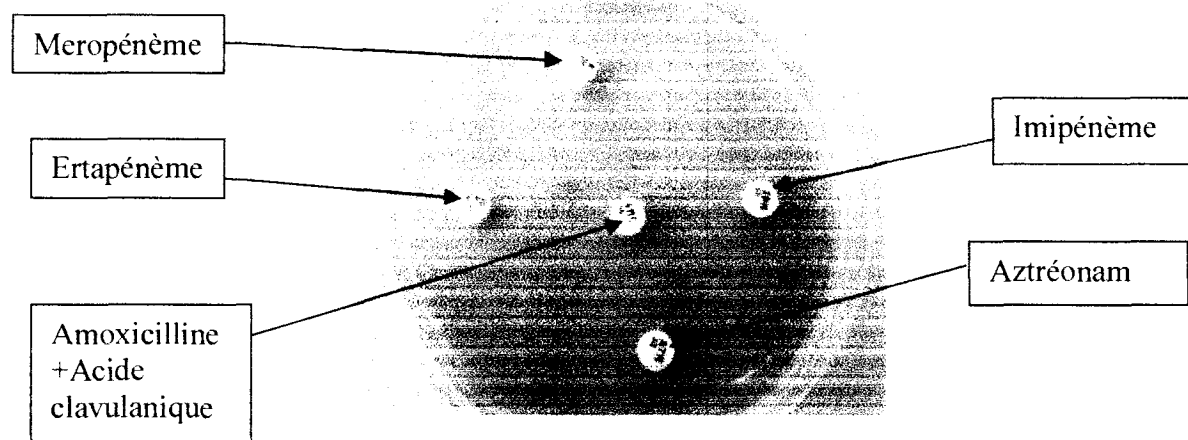
-A partir d'une culture pure de 18-24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5-10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%. Homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5MF ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm, l'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

Ensemencement :

- Tromper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube a fin de décharger au maximum .
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boites de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 4 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90mm.
- Tester la liste des antibiotiques (Imipénème IMP , Méropénème MER, Ertapénème ERT, Amoxicilline+Acide Clavulanique AMC, Aztréonam ATM).
- Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince bactériologique stérile et ne pas déplacer les disques après application.
- incubé pendant 18-24h à 35-37°C.



**Figure11:Antibiogramme avant incubation.**

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le tableau de lecture. (Annexe VI)
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

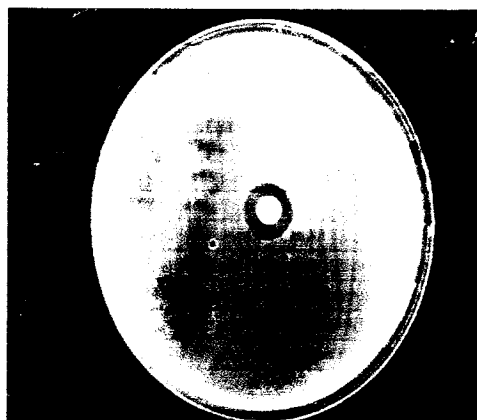
NB : L'antibiogramme est validé d'abord avant toute lecture à l'aide de la souche de contrôle de qualité des entérobactéries *Escherichia coli* ATCC 25922.

Interprétation :

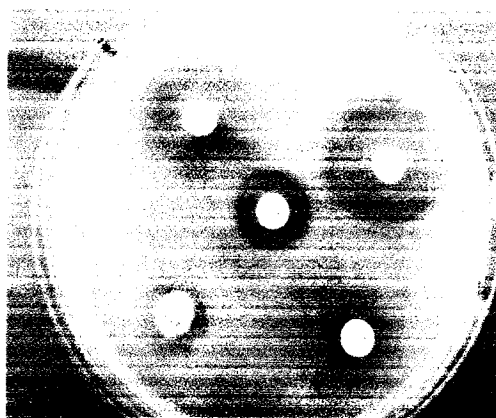
La recherche des souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes a été déterminée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition des disques d'imipénème, méropénème et ertapénème et /ou détermination des CMI correspondantes .

Une entérobactérie est suspectée d'être productrice de carbapénémase si elle présente l'un des critères suivants :

- Diamètre d'inhibition pour méropénème et imipénème < 22mm .
- Diamètre d'inhibition pour ertapénème < 21mm.
- Présence de colonies discrètes dans la zone d'inhibition des carbapénèmes (surtout ertapénème).
- CMI (E-test) pour les carbapénèmes  $\geq 2\mu\text{g} / \text{ml}$ .
- CMI (E-test) pour ertapénème  $> 0.5\mu\text{g} / \text{ml}$ .



Résistance à l'imipénème



Résistance à l'ertapénème

**Figure 12:** Entérobactérie résistante aux carbapénèmes.

(Originale)

#### V.3.4.2. Les tests complémentaires pour la détermination de type de carbapénémase:

Les tests complémentaires qui ont été effectués pour déterminer le type de carbapénémase durant notre étude sont :

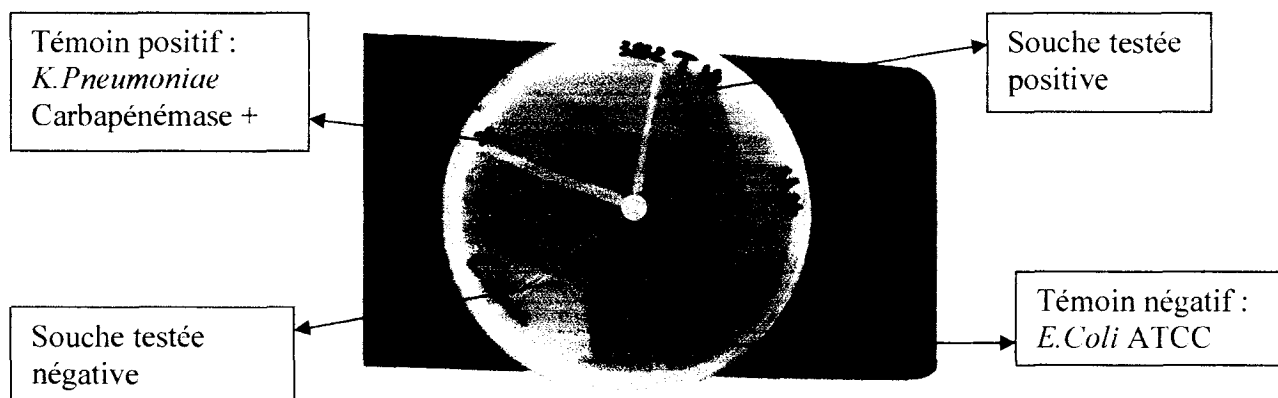
- Synergie entre Amoxicilline+Acide Clavulanique (AMC) et Ertapénème (ETP) :



Image de synergie entre AMC et ETP

**Figure13:** Entérobactérie résistante à l'ertapénème plus image de synergie.  
(Originale)

- Test de Hodge modifié :



**Figure 14:** Test de Hodge modifié (Originale)

- Test d'inhibition par l'EDTA :

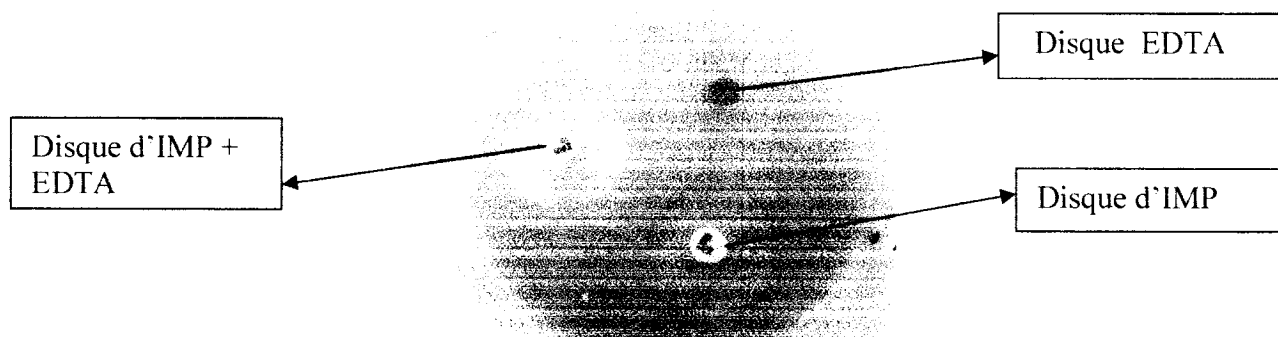


Figure15 : Test d'inhibition par l'EDTA (Originale)

# Chapitre VI

## Résultats

---

## CHAPITRE VI : RESULTATS

Les résultats obtenus se répartissent en deux volets :

- Les résultats de l'étude rétrospective qui s'est étalée sur une période de trois années allant de Janvier 2012 à Décembre 2014.
- Les résultats de l'étude prospective qui a duré quatre mois (de Janvier à Avril 2015).

Les résultats étaient exploités à partir d'un registre pour l'étude prospective et grâce au logiciel WHONET 5.6, pour l'étude rétrospective, ceci est un logiciel utilisé pour la surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

### VI.1. Les caractéristiques épidémiologiques des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes :

Durant la période d'étude , nous avons colligé 1943 souches d'entérobactéries provenant de différents types de prélèvements , issus soit de sujets hospitalisés ou externes .sur ces 1943 entérobactéries, 25 présentaient une résistance à l'un des carbapénèmes testés , soit une prévalence de 1.28 % .

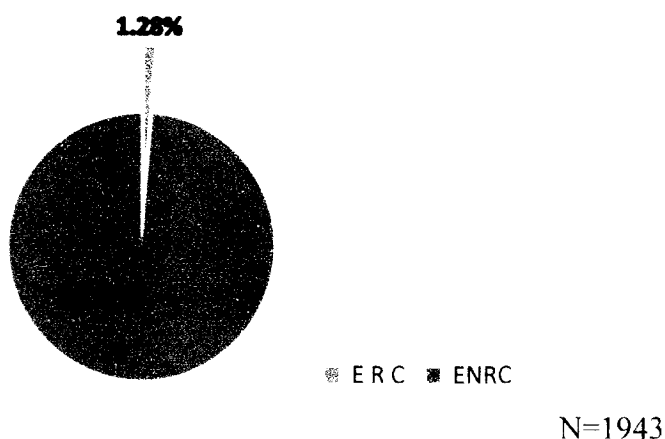


Figure 16 : Prévalence des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

ERC : Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

ENRC : Entérobactéries non résistantes aux carbapénèmes.



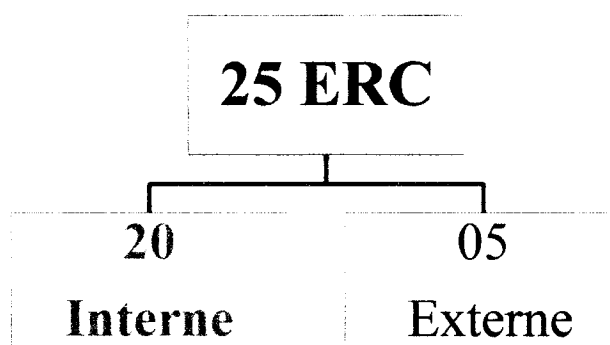
Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus:

**Tableau V: Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le service et le type de prélèvement.**

Numéro de souches	Genre /Espèce	Service	Prélèvement
1	<i>K.pneumoniae</i>	Externe	Prélèvement vaginale
2	<i>K.pneumoniae</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
3	<i>K.pneumoniae</i>	Externe	Urine
4	<i>K.pneumoniae</i>	Chirurgie générale	Pus
5	<i>K.pneumoniae</i>	Traumatologie	Pus
6	<i>K.pneumoniae</i>	ORL	Pus
7	<i>K.pneumoniae</i>	Chirurgie générale	Urine
8	<i>K.pneumoniae</i>	Rééducation	Urine
9	<i>K.pneumoniae</i>	Chirurgie générale	Urine
10	<i>K.pneumoniae</i>	C.A.C Chirurgie	Abcès périnéale
11	<i>K.pneumoniae</i>	Hématologie	Hémoculture
12	<i>K.pneumoniae</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
13	<i>E.cloacae</i>	Traumatologie	Fragment d'OS
14	<i>E.cloacae</i>	Externe	Urine
15	<i>E.cloacae</i>	Neurochirurgie	LCR
16	<i>E.cloacae</i>	C.A.C Chirurgie	Pus
17	<i>E.cloacae</i>	ORL	Pus auriculaire
18	<i>E.coli</i>	Externe	Urine
19	<i>E.coli</i>	Orthopédie	Fragment d'os
20	<i>E.coli</i>	Externe	Urine
21	<i>M.morgannii</i>	CAC- Réanimation	Pus
22	<i>M.morgannii</i>	CAC -Réanimation	Pus
23	<i>E.sakazakii</i>	CAC Hématologie	Hémoculture
24	<i>E.aerogens</i>	Chirurgie générale	Pus
25	<i>K.oxytoca</i>	C.A.C Hématologie	Prélèvement de gorge

#### VI.1.1. Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon la provenance des prélèvements (externe/interne) :

Les résultats de notre étude montrent que la plupart des souches sont isolées chez les patients hospitalisés avec 20 souches sur 25 et seulement 5 souches sur 25 chez les patients externes.



**Figure17** : Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon la provenance

#### **VI.1.2. Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le service :**

Sur les 25 entérobactéries résistantes aux carbapénèmes détectées : 09 provenaient des services de spécialités chirurgicales à savoir :

(4 en chirurgie générale ,2 en neurochirurgie ,2 en traumatologie et 1 en orthopédie suivie par le CAC avec 07 dont 3 hématologie , 02 en réanimation et 02 en chirurgie du centre anticancéreux.

#### **VI.1.3. Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes selon le type de prélèvements:**

Nous constatons que les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes que nous avons isolés proviennent dans la grande majorité des cas des pus suivi par les urines puis les hémocultures.

#### **VI.1.4. Répartition des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes isolées par genre bactérien :**

Dans cette étude on note la présence d'une diversité de genres bactériens, notons que *K.pneumoniae* arrive en tête de liste avec 12 souches sur 25 suivi par *E.cloacae* avec 05 souches sur 25 puis *E.coli* avec 03 souches sur 25.

#### **VI.2. Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et antibiotiques :**

Le tableau ci-dessous résume les résultats de l'antibiorésistance des souches ERC aux molécules suivantes imipénème, ertapénème, aztréonam ainsi que les résultats des tests phénotypiques de détection de types de carbapénémase effectués.

**Tableau VI:** Antibiorésistances des ERC et tests phénotypiques de détection de types de carbapénèmase

N°	Germes	Antibiogramme			Tests complémentaires			
		IMP /MEM	ETP	ATM	Test de Hodge modifié	EDTA	BLSE	Synergie entre AMC et ETP
		Interprétation						
1	<i>K.pneumoniae</i>	I	I	S	+	-	-	-
2	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	R	+	-	+	-
3	<i>K.pneumoniae</i>	R	R	S	+	-	-	-
4	<i>K.pneumoniae</i>	S	I	R	-	-	+	-
5	<i>K.pneumoniae</i>	I	R	R	-	-	+	-
6	<i>K.pneumoniae</i>	R	I	R	-	-	+	-
7	<i>K.pneumoniae</i>	S	R	R	+	-	+	-
8	<i>K.pneumoniae</i>	S	I	R	+	-	+	-
9	<i>K.pneumoniae</i>	S	R	S	-	-	+	-
10	<i>K.pneumoniae</i>	S	R	R	-	-	+	+
11	<i>K.pneumoniae</i>	S	I	R	+	-	+	+
12	<i>K.pneumoniae</i>	S	I	R	+	-	+	+
13	<i>E.cloacae</i>	R	R	R	+	+	-	-
14	<i>E.cloacae</i>	S	I	R	+	-	+	-
15	<i>E.cloacae</i>	S	R	R	+	-	+	-
16	<i>E.cloacae</i>	S	R	R	+	-	-	-
17	<i>E.cloacae</i>	S	I	R	-	-	-	-
18	<i>E.coli</i>	S	R	R	-	-	-	-
19	<i>E.coli</i>	S	R	R	+	-	+	+
20	<i>E.coli</i>	I	R	R	-	+	-	-
21	<i>M.morgannii</i>	I	S	R	-	-	-	-
22	<i>M.morgannii</i>	I	S	I	-	-	-	-
23	<i>E.sakazakii</i>	R	R	R	-	-	+	+
24	<i>E.aerogens</i>	S	I	R	-	-	-	-
25	<i>K.oxytoca</i>	S	I	R	+	-	+	+

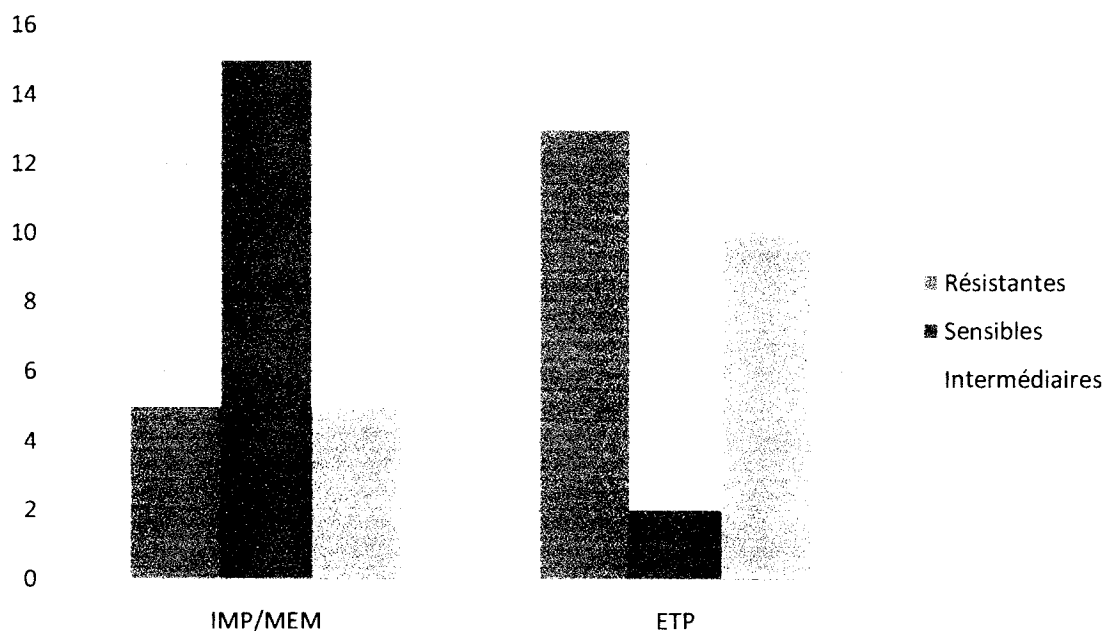
S : sensible, R : résistant, I : intermédiaire

- **Résistances des ERC à l'imipénème ou méropénème :**

Sur les 25 ERC : 05 étaient résistantes à l'imipénème et /ou méropénème, 05 souches intermédiaires, et les 15 autres sensibles.

- **Résistances des ERC à l'ertapénème :**

Les résultats obtenus montrent que 13 souches sur 25 sont résistantes à l'ertapénème, 10 souches sur 25 ont une résistance intermédiaire, et les 02 autres souches sont sensibles.



**Figure 18 :** Taux de résistance des ERC aux différentes molécules de la famille des carbapénèmes testées

- **Résistance des ERC à l'aztréonam :**

On constate que la majorité de ces entérobactéries sont résistantes à Aztréonam (21 sur 25).

- **Les résultats de la recherche de la BLSE :**

La recherche de la BLSE a été effectuée chez les différentes souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, certaines ont présenté le phénotype BLSE.

Nous avons pu constater qu'environ 2/3 des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes isolées étaient productrices de BLSE (15 souches sur 25).

- La détermination de type de carbapénémase a été réalisée pour toutes souches d'entérobactérie qui montre une résistance à un ou plusieurs carbapénème testés est ceci a été fait par les tests suivants :

- **Recherche de synergie entre AMC et ETP :**

La synergie entre AMC et ETP a été détectée chez 06 souches sur les 25.

- **Test de Hodge modifié :**

D'après le résultat de ce test 13 souches sur les 25 étaient productrices de carbapénèmases (test de Hodge positif).

- **Test à l'EDTA :**

Nous avons constaté que 02 souches sur les 25 étaient EDTA positif.

# Chapitre VII

## Discussion

## CHAPITRE VII: DISCUSSION

- Les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, merpénème et doripénème) sont aujourd'hui parmi les traitements de choix des infections sévères dues aux entérobactéries multi résistantes. Mais leur utilisation pourrait être compromise par l'émergence de souches présentant une résistance aux carbapénèmes.

La connaissance et la surveillance des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont primordiales dans la prise en charge des infections générées par ces entérobactéries multi résistantes.

- Dans ce but nous avons réalisés cette étude, qui s'est étalée sur une période de trois ans et quatre mois allant de Janvier 2012 à Avril 2015, et qui a démontré que la prévalence des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes au sein de notre hôpital est de 1.28 %, ce taux est plus élevé par rapport au taux retrouvé :

- En France où la prévalence de cette résistance est  $<1\%$  entre 2011 et 2012 dont le taux des carbapénémases est de 10% (**Enquête ONERBA 2011-2012**).

- Au Canada : Entre 2010 et 2013, 390 cas d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont déclarés et le taux d'incidence des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes a presque doublé, passant de 0.15 pour 10 000 jours-patients en 2010 à 0.26 pour 10 000 jours-patients en 2013. (**K.Outhwite et G.Taylor 2015**)

Par ailleurs ce taux est faible par rapport aux taux rapporté dans certaines régions du monde qui sont actuellement considérées comme des zones d'endémie (Inde, Grèce, Italie). (**Nordmann.p et al 2012**)

Notons que plus de la moitié des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (14 souches) ont été isolés durant la période prospective de l'étude, ce qui montre une augmentation très importante du taux des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes isolées au CHU Blida. Cette augmentation croissante est aussi présente en France où on compte 10 épisodes signalés en 2009, 28 en 2010, 113 en 2011, 236 en 2012 et 231 sur les 8 premiers mois de 2013 (un épisode est un ou plusieurs cas infecté(s) ou colonisé(s) par une EPC et relié par une chaîne de transmission épidémiologique). (**RAISIN 2013**)

- Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont essentiellement isolées des prélèvements issus des patients hospitalisés (20 souches sur les 25 isolats). Ces résultats sont en accord avec les données du réseau national

**Tableau VII:** Nombre d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes chez les patients hospitalisés entre 2009 et 2011 en Algérie (ARNN).

	N	n
2009	08	06
2010	21	12
2011	05	02

**N** : nombre total d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes.

**n** : nombre d'entérobactérie résistantes aux carbapénèmes chez les patients hospitalisés.

- La plupart des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont isolées chez les sujets hospitalisés laissant suggérer qu'il puisse s'agir d'une infection nosocomiale et plus particulièrement au niveau des services de spécialité chirurgicale (9 souches sur les 25 isolats) puis le CAC (7 souches sur les 25 isolats).

Ce taux élevé peut être expliqué par la présence de facteurs prédisposant à l'infection par des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, et qui sont :

- l'immunodépression
- la notion de prise antérieure d'antibiotiques à large spectre. (N.Grall et al 2011)

A savoir que les patients hospitalisés au CAC sont des immunodéprimés et ils sont souvent mis sous antibiotiques à large spectre.

A noter également l'utilisation anarchique et abusive des antibiotiques à large spectre entre autre l'imipénème au niveau des services de spécialité chirurgicale.

- La majorité des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes sont issus de suppuration ceci est prévisible vu que la plupart des patients ont été hospitalisés au sien des services de spécialité chirurgicale donc ont subit des interventions où l'infection sur site opératoire est fréquente.

- Sur le plan microbiologique, parmi les bactéries identifiées, il ressort que *K.pneumoniae* et *E.cloacae* sont les bactéries les plus fréquemment résistantes aux carbapénèmes.

Cette fréquence a été également rapportée dans d'autre pays :



**Tableau VIII:** Taux des *K. Pneumoniae* résistante aux carbapénèmes dans différents pays (N.Grall et al 2011)

Pays	Année	Taux <i>K.Pneumoniae</i>
France	2013	59%
Grèce	2011	68.2%
New York	2011	72%

- L'étude de l'antibiorésistance de ces bactéries aux différentes carbapénèmes nous a permis de faire les constatations suivantes:

- Le taux de résistance à l'ertapénème (13 souches sur les 25 isolats) est plus élevé que le taux de résistance aux autres carbapénèmes (imipénème et merpénème : 4 sur 25) à savoir que l'ertapénème est le carbapénème qui possède la meilleure sensibilité pour la détection des EPC. (L.Dortet 2014)

Pour ce qui est de la résistance observée chez souches de *Morganella morganii* isolées durant notre étude (résistance à l'imipénème et sensibilité à l'ertapénème) elle peut s'expliquer par le fait que les espèces de la tribu des *Proteae*, notamment *Proteus mirabilis* et *Morganella morganii*, sont intrinsèquement moins sensibles aux carbapénèmes (notamment à l'imipénème) que les autres espèces d'entérobactéries à cause de PLP naturellement peu affines pour ces molécules. (CA –SFM 2012)

- Deux mécanismes peuvent causer la résistance des entérobactéries aux carbapénèmes :

- la production de carbapénémases ;
- un défaut d'accumulation de l'antibiotique associé à la production de céphalosporinase et/ou de BLSE.

Nous avons pu constater la sécrétion de carbapénémases chez 13 souches et ceci grâce au test de Hodge modifié, ceci est inquiétant vu le risque de dissémination étant donné que ces enzymes sont codées par des structures génétiques mobiles.

Le test à l'EDTA étant revenu positif pour 2 souches ont conclu qu'il s'agit de MBL (Métallo-β-Lactamase).

le taux faible des souches productrices de MBL peut s'expliquer par à un bas niveau de résistance à l'imipénème (de faux négatifs ont été rapportés pour des souches ayant une CMI de l'imipénème supérieures ou égales à 4 mg/L).(P.Nordmann et al 2011)

Une discordance entre le test de Hodge modifié et le test à l'EDTA a été noté pour une souche (test de Hodge - et le test à l'EDTA +) ceci peut s'expliquer par un test de Hodge qui peut parfois être faussement négatif, notamment avec les souches productrices de carbapénémases de type NDM-1. (L. Dortet et al 2014)

Parmi les 13 souches productrices de carbapénémases (TH+), 04 souches ont présenté une synergie entre ERT et AMC et sont résistantes à aztréonam, à savoir que cette résistance est présente chez les entérobactéries productrices de carbapénémases de classe A type sérine KPC SME NMC-A, IMI (K.Rahal et al 2011) ainsi on peut suspecter que ces souches sont productrices de carbapénémases de type A.

Noter que 6 souches ne sont pas productrices de carbapénémase (test de Hodge -) et présentent le profil BLSE avec une résistance ou une sensibilité intermédiaire à l'un des carbapénèmes testés ceci laissant suggérer qu'il puisse s'agir d'une résistance due à l'association de la BLSE avec l'imperméabilité de la paroi bactérienne.

Toute détection phénotypique des mécanismes de résistances devrait être confirmée par des techniques de biologie moléculaire offrant une meilleure spécificité pour la détermination des types de carbapénémase.

# Conclusion

# CONCLUSION

Notre travail a eu pour but de déterminer le taux des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, leurs caractéristiques épidémiologiques et le leur mécanisme de résistance durant une période de trois ans et quatre mois allant de Janvier 2012 à Avril 2015.

Au terme de notre étude portant sur 1943 entérobactéries dont 25 sont résistantes aux carbapénèmes, plusieurs conclusions ont été tirées :

La prévalence des entérobactéries résistantes aux carbapénèmes au sein de notre hôpital est de 1.28 % (ce taux est inquiétant). Ces dernières sont plus présentes en milieu hospitalier que communautaire et se trouvent le plus dans les services chirurgicaux.

Les entérobactéries les plus fréquemment rencontrés sont représentés principalement par *K.pneumoniae* et *E.cloacae*.

Pour ce qui du mécanisme de résistance de ces souches vis à vis des carbapénèmes presque la moitié de ces entérobactéries sont productrices de carbapénémase.

La résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries, indépendamment du mécanisme, pose des problèmes d'ordres cliniques et thérapeutiques, mais la résistance par production de carbapénémases est la plus inquiétante.

Les carbapénèmes sont donc des molécules précieuses qu'il convient de préserver par la maîtrise de leur prescription et ce d'autant qu'il n'existe actuellement pas de perspective proche de mise sur le marché de nouveaux antibiotiques.

L'isolement de ce type de souches au CHU BLIDA est un réel problème en ce qui concerne les BMR, cela impose une surveillance plus étroite des infections nosocomiales et des moyens de détection plus élaborés au laboratoire pour limiter la diffusion de ces bactéries.

-A-

- ◆ **ADELIN BOUTET-DUBOIS, ALIX PANTEL, ALBERT SOTTO, JEAN PHILIPPE LAVIGNE**, avril 2012 Entérobactéries productrices de carbapénémases ,lettre d'information du CClin Sud-Est ,destinée aux Acteurs de la Lutte contre les Infections Nosocomiales & Associées aux Soins , n°2 Page 1-5.
- ◆ **AGGOUNE.N, TALI-MAAMAR.H, ASSAOUS.F, BENAMROUCHE.N, NAIM. M, RAHAL.K.** 2014 Emergence of plasmid mediated carbapenemase OXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain in Algeria. *J Global Antimicrob Resist* .
- ◆ **AGGOUNE .N , TALI-MAAMAR.H , ASSAOUS.F , GUETTO.B , ZEROUKIA , OUAR-KORICHL.M.N ,BEROUAKEN.S ,AZROU.S ,KHEMISSI.S. K, HAMIDI.M , AMMARI.H ,BENAMROUCHE.N , NAIM.M ,RAHAL.K** , 2014 OXA-48 En Algérie, vers la généralisation, Communication affiché (RICAI ).
- ◆ **ANDREAS TIETZ. PF, ANDREAS. F. WIDMER.** 2004  $\beta$ -lactamases à spectre étendu : implications pour l'hygiène hospitalière.*Swiss-NOSO*;11(4):29-32.
- ◆ **AVRIL (J-P), DABERNAT H., DENIS H., MONTIEL H.,** 1992. Bactériologie clinique, 2<sup>ème</sup> édition : Ellipses, p : 149-151.

-B-

- ◆ **BENOUDA. A., TOUZANI.O., KHAIRELLAH. M. T., ARAJ. G. F. and MATAR.G. M.** (2010) First detection of Oxacillinases- mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco *annals of tropical medicine and Parasitology* 104;327-330
- ◆ **BUEHLMANN. M, BRUDERER. T, FREI. R, WIDMER. AF.** 2011 Effectiveness of a new decolonisation regimen for eradication of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of hospital infection*;77(2):113-117.

-C-

- ◆ **CANTON .R; NOVAIS. A; VALVERDE.A;** 2008 prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin microbial infect*;144-53
- ◆ **CATTOIR.V. and DAUREL. C.** (2009) Quelles nouveautés en antibiothérapie? *Médecine et Maladies Infectieuses* 2966, 1-20.
- ◆ **CARBON.C, REGNER .B, SAIMOT . A-G , VILDE .J-L , YENI. P,** 1995. Médicaments anti-infectieux, ed : Flammarion Médecine Sciences, .page :480 ;500

- ◆ **CAVALLO .J-D , FABRE .R, JEHL.F, RAPP.C, GARRABE .E,** 2004. Les bêta-lactamines. EMC/ Maladies infectieuses (8-004-c-10).
- ◆ **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM).** Recommandations 2010, 2011, 2012 et Annexe 1 du CASFM 2012 : Lettre d'information duCA-SFM concernant la détection de la production de carbapénèmases chez les entérobactéries
- ◆ **CUZON .G, NAAS.T, NORDMANN.P.** (2010) Carbapénèmases de type KPC : quel en jeu en microbiologie clinique ? ; Pathologie Biologie 58, P 39–45

-D-

- ◆ **DEMIR.S, SOYSAL. A, BAKIR. M, KAUFMANN. ME, YAGCIA.** 2008  
Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric wards: a nested case-control study. Journal of paediatrics and child health;44(10):548-553
- ◆ **DENIS .F, PLOY .M-C , MARTIN .C, BINGEN.E, QUENTIN.R.** 2007.  
Bactériologie : techniques usuelles. : Elsevier Masson, p : 257.
- ◆ **DIMOU. V, DHANJI. H, PIKE. R, LIVERMORE. D.M, WOODFORD. N.** (2012)  
Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48 like carbapenemases in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67, 1660-1665
- ◆ **DORTET.L,RADU.I,GAUTIER.V, BLOT. F, CHACHATY.E, ARLET. G.** 2008  
Intercontinental travel of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-associated with OXA-9 and TEM-1. J Antimicrob Chemother; ;61:455- 457
- ◆ **DORTETL, POIREL L, NORDMANN P.** 2013 Epidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénèmases. Feuillettsde Biologie. (312).
- ◆ **DORTET.L, CUZON.G et NORDMANN.P** Janvier 2014, Note technique : Détection des souches d'entérobactéries productrices d'une carbapénémase, CNR *associé de la résistance aux antibiotiques*, « Entérobactéries productrices de carbapénèmases ». Hôpital de Bicêtre, Paris -Sud . .
- ◆ **DURANDANNE — LAURE:** Analyse des consommations antibiotiques et des résistance bactérienne dans huit établissements de santé de haute Normandie . thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie , université de ROUEN , UFR de medecine et de pharmacie , soutenue le 05 juin 2014.

-F-

- ◆ **FALAGAS. M.E , KARAGEORGOPOPOULOS. D.E , NORDMANN. P.** (2011) Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolysing enzymes. *Future Microbiology* 6, 653-666 .
- ◆ **FANKHAUSER. C, ZINGG. W, FRANCOIS. P, DHARAN. S, SCHERENZEL. J, PITTED.D** 2009 Surveillance of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Swiss Tertiary Care Hospital. *Swiss medical weekly*:139(51-52) ,747-751 .
- ◆ **FAUCHERE (J-L), AVRIL (J-L).** 2002. Bactériologie générale et médicale, 2<sup>ème</sup> édition : Ellipses, , P : 141-144 et 141-158.
- ◆ **FIGARELLA .J, LEYRAL.G, TERRET .M,** 2004. Microbiologie générale et appliquée, édition : Delagrave, Paris, page :285.
- ◆ **FRITZ. H KAYSER ,** 2003, Manuel de poche de microbiologie médicale, 11<sup>ème</sup> édition, pages :290-292.

-G-

- ◆ **GARY.D , OVERTURF. M.D ,** (2010) Doripenem, an early look at a carbapenem not yet approved for pediatrics. *The pediatric Infectious Disease Journal* 29, 163-165.
- ◆ **GISKE. C. G , GEZELIUS. L, SAMUELSAN. O, WARNER. M, SUNDSFJORD. A , WOODFORD. N.A,** (2011) Sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *K.pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical Microbiology and Infection* 17, 552-556.
- ◆ **GRALL.N, ANDREMONT.A, ARMAND-Lefèvre. L ,** (2011) Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse ? *Journal des anti-infectieux* 16, 1-16

-H-

- ◆ **HALABY.T, AI NAIEMI.N, KUTYMANS. J, VAN DER PALEN. J, VANDEN BRAUCKE-GRAULS.C.M ,** 2013 Emergence of colistin resistance in *Enterobacteriaceae* after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrobial agents and chemotherapy* ;57(7): 3224
- ◆ **HELLER.I, GRIF.K , ORTH. D,** 2011. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *E. cloacae* Isolates in the Tyrol, Austria. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID Poster 1344.

- ◆ **HILTY. M, BETSH.BY, BOGLI-STUBER. K, HEINIGER. N, STADLER. M,KUFFER.M** . 2012 Transmission dynamics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in the tertiarycare hospital and the household setting. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*;55(7):967-975.
- ◆ **HSUEH. P. R.** 2010 New Delhi Métallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): An Emerging Threat Among *Enterobacteriaceae*. *Journal of the Formosan Medical Association* 109, 685–687.

-J-

- ◆ **JOLY .B, REYNAUD . A,** 2003. Entérobactéries : Systématique et méthodes de diagnostic. édition : Lavoisier, p: 03-06.

-K-

- ◆ **KAASE. M , SZABADOS. F, ANDERS. A , GATERMANN. S.G,** 2011. Fosfomycin susceptibility testing in *Enterobacteriaceae* producing KPC-2, OXA-48 and VIM-1 carbapenemases. London, 21<sup>nd</sup> ECCMID Poster 1173 . ]
- ◆ **Kassis-Chikhani N,Decre D,Ichai P.** 2010 Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother*;65: page :40
- ◆ **KOSMIDIS. C, POULAKOU.G, MARKOGIANNAKIS. A, DAIKOS. G.L** 2012 . Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *European Infectious Disease*, 28-34.

-L-

- ◆ **LARPENT (J-P)** ,2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne, ed : Tec et Doc, Paris
- ◆ **LAURENT.C, RODRIGUEZ-VILLALOBOS.H, ROST. F, STRALE.H, VINCENT. JL, DEPLANO.A** 2008 Intensive care unit outbreak of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* controlled by cohorting patients and reinforcing infection control measures. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*;29(6):517-524.
- ◆ **LEE.K , CHONG. Y, SHIM. H.B, Kim Y. A , Yong .D, YUM. J. H** , Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas*.
- ◆ **LEVAST.M , POIREL. L, CARRERA. A , DEIBER. M , DECROISSETTE.E , MALLAVAL. F.O , Lecomte C** ,2001 EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -



lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical and Microbiology Infection* 7, 88-91.

- ◆ **LEVAST. M, POIREL. L., CARRER. A., DEIBER.M., DECROISSETTE. E, MALLAVAL.F.O, LECOMTE.C , NORDMANN.P.** 2011 Transfer of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 944-945.
- ◆ **LIVERMORE.D.M , MUSHTAQ.S, WARNER. M ,** 2010 Activity of BAL30376 (monobactam + BAL19764 + BAL29880 + clavulanate) versus Gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65, 2382–2395.
- ◆ **LIVERMORE. D.M , MUSHTAQ. S , WARNER. M , ZHANG. J, MAHARJAN. S, DOUMITH. M, WOODFORD. N.** 2011 Activities of NXL104 Combinations with ceftazidime and aztreonam against Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 390-394.
- ◆ **LIVERMORE. D.M, MUSHTAQ.S, WARNER.M, MIOSSEC.C, Woodford. N.** 2008 NXL104combinations versus *Enterobacteriaceae* with CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 1053–1056.

-M-

- ◆ **MINORE.L, VERON .M,** 1989 *Bactériologie médicale*. Paris : Flammarion, 2<sup>ème</sup> édition, p : 273-391.
- ◆ **MIRIGOU.V, CORNAGLIA. G , EDELSTEIN.E , GALANI. I , GISCKE.C , GNIADKOWSKI.M , MALAMOU-LADA.E , CANTON. R.** 2010 Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens :detection and surveillance issues. *Clinical and Microbiology Infection* 16, 112-122.

-N-

- ◆ **Naas T, NORDMANN.P ,CUZON.G.** 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet infectious disease*:228-236.
- ◆ **NORDMANN.P, VEDEL.G, POYART.C.** 2005 Plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing-bactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*;49:4423 – 4424.

- ◆ **NAJIBY KASSIS-CHIKHANI.** *Klebsielle Pneumoniae* pathogène nosocomial, résistance et virulence. Thèse pour l'obtention de grade de docteur de l'université Pierre et Marie Curie - Paris .Soutenue le 21 mars 2012.
- ◆ **NAUCIEL.C,** 2000 Bactériologie médicale, ed : Masson, p, 51-69, 125-145.
- ◆ **NAUCIEL.C.Vildé (J.L )**. 2005 Bactériologie médicale ;2ème édition ; pages : 49-54-56.
- ◆ **NEUMAN .M,** 1990 VADE-MECUM des antibiotiques; 5<sup>ème</sup> éd : Maloine, Paris, p 13-37 , 219-243.
- ◆ **NORDMANN.P , DORTET.L, POIRELL** , 2012 Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* : here is a storm ! Trends in Molecular Medecine 18, 263-272.
- ◆ **NORDMANN P.** 2010 Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. Médecine/Sciences 26, 950-959
- ◆ **NORDMANN.P,** 2011 Transfer of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 944-945.

-O-

- ◆ **ONERBA :** Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques en France. Enquête 2011-2012
- ◆ **.OUTHWITE.K ET TAYLOR.G** .Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens – Rapport de 2015

-P-

- ◆ **PATEL.J.B.** 2009 Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology and Laboratory Detection. ClinicalMicrobiologyNewsletter Vol.31 N°8 .
- ◆ **PETRELLA.S, ZIENTAL-GELUS. N, MAYER. C, RENARD. M, JARLIER. V, SOUGAKOFF,GENETIC.W.** 2008 Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (EBSBL) KPC-2 identified in twostrains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. Antimicrob Agents Chemother;52: P 3725-36
- ◆ **PHILIPPON. A., ARLET.G.** 2005 Les  $\beta$ -lactamases chez les bacilles à Gram négatif : que de nouveautés en 15 ans ! Elsevier Masson Paris Antibiotiques 7, 247-259.
- ◆ **PHILIPPON. A,** 2008. La résistance bactérienne : Définitions, mécanismes, évolution 2008 /EMC : Maladies infectieuses, 8-006-N-10 .

- ◆ **POIREL. L , POTRON. A , NORDMANN. P.** 2012 OXA-48 like carbapenemases : the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67, 1597-1606.
- ◆ **POTTUMARTY.S,MOLAND.E.S.,JURETSCHKO.S.** 2003 NmcA carbapenem hydrolyzing enzyme in *Enterobacteriaceae* in North America.*Emerg Infect Dis*;9: 999-1002.
- ◆ **POURNARAS. S, PROTONOTARIOU. E, VOULGARI. E, KRISTO.I, DIMITROULIA. E, VITTLID .**2009.Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greece. *Antimicrob Chemother*; 64:348–52.

-Q-

- ◆ **QUENNAN.AM,BUSH.K.** 2007 Carbapenemases :the versatile betalactamases.*Clin Microbiol Rev*;20:440-58.

-R-

- ◆ **RAHAL.K, BENSLIMANLA, TALIMAAMAR.H, MISSOUM.M.F. , K.KECHIH BOUNAR.S ; AMMARI.H.** 2011 Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire), 6<sup>ème</sup> édition,.
- ◆ **RESEAU D'ALERTE, D'INVESTIGATION ET DE SURVEILLANCE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES (RAISIN).** Entérobactéries productrices de carbapénémases, EPC, Bilan de la situation nationale, mise à jour au 16 septembre 2013 : <http://www.invs.sante.fr/epc>
- ◆ **ROUVEIX B ,** 1990 Médicaments en pathologie infectieuse , ed MASSON. , P42-43.

-S-

- ◆ **SCHORDERT.M ,**1989 Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques,édition ,Pages: 655.661.675.691
- ◆ **SEAH.C, LOW.D. E, PATEL.S. N, MELANO.R. G.** 2011 Comparative Evaluation of a Chromogenic Agar Medium, the Modified Hodge Test, and a Battery of Meropenem-Inhibitor Discs for Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 1965–1969.
- ◆ **SECK ROSE .**Résistance des souches d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* isolés

des infections urinaires . these pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie , université Cheikh Anta Diop de Dakar , faculté de médecine , département de pharmacie , soutenue le 08 janvier 2005.

-T-

- ◆ TALBERT.O, 2011 guide pharmaco-clinique , 3<sup>ème</sup> édition ;page :946 .
- ◆ TEGMARK WISELL.K, HAEGMANN.S, GAZELIUS.L, THOMPSON.O, GUSTAFSSON.I, RIPA.T. 2007 Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. EuroSurveill:E071220.3.:12.

-V-

- ◆ VADING. M., SAMUELSAN. O., HALDORSEN. B., SUNDSFIORD. A , GISCKE C.G , 2010 Comparison of disk diffusion, E test® and VITEK2® for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clinical Microbiology and Infection 17, 668-674.

-W-

- ◆ WALTHER-RASMUSSEN.J,HOIBY.N ; 2006 OXA-type carbapenemases.J Antimicrob Chemother; 57:373- 83.
- ◆ WOLFFA.M , JOLY-GUILLOUB.M.G , PAJOTC.O. 2009 Carbapenems. Comparative review of carbapenems. Réanimation 18, 199-208.
- ◆ WOODFORD.N, ZHANG. J, WARNER.M, KAUFMANN.M.E, MATOS.J, MACDONALD.A. 2008 Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the UnitedKingdom. J Antimicrob Chemother;62:1261-4.

-Y-

- ◆ YALA .D, MERAD.A.S, MOHAMEDI .D, OUARKORIH M.N, 2001 Résistance bactérienne aux antibiotiques. Médecine de MAGREB. n°29.

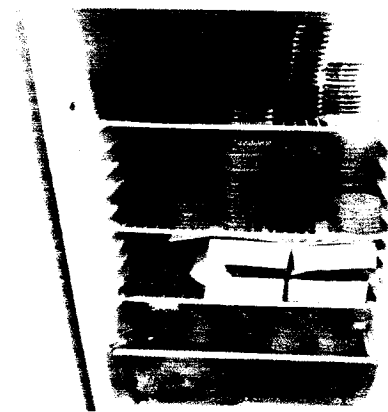
**Webographie :**

Site internet :[www.bacteriologie.net](http://www.bacteriologie.net)

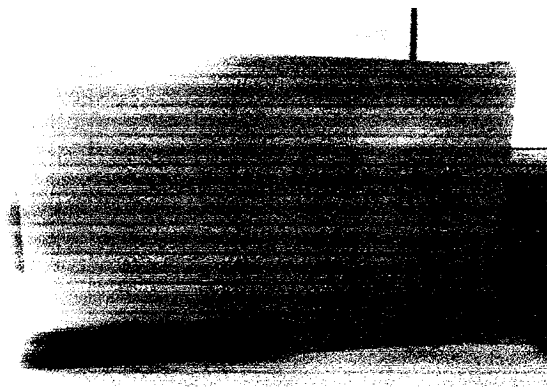
# Annexes

**ANNEXE I : Matériel non biologiques**

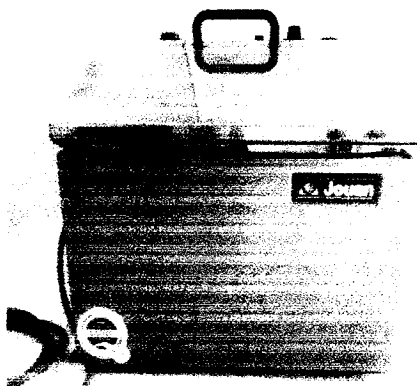
<b>Equipements</b>	<b>Fournitures</b>	<b>Verrerie</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Paillasse</li><li>- Levier et eau courante</li><li>- Eau physiologique</li><li>- Bec bensen</li><li>- Microscope optique</li><li>- Etuve à 35°C.</li><li>- Séchoir</li><li>- Réfrigérateur</li><li>- Congélateur</li><li>- Bain-marie</li><li>- Densitomètre</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Blouse de laboratoire</li><li>- Gants</li><li>- Marqueurs</li><li>- Savon pour les mains</li><li>- Liquide désinfectant</li><li>- Ances, ciseaux et pinces</li><li>- Collecteurs des objets</li><li>- Portoirs pour tubes</li><li>- Distributeur des disques d'ATB</li><li>- Bocal</li><li>- Bougie</li><li>- Ecouillons en coton stérile</li><li>- Jarre</li><li>- Poires</li><li>- Seringues stériles</li><li>- Huile à immersion</li><li>- Huile de vaseline stérile</li><li>- Pied à Coulisse métallique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Boite de Pétrie 90 mm de diamètre en plastiques.</li><li>- Lame et lamelle</li><li>- Pipettes Pasteur</li><li>- Tubes à essai stériles</li><li>- Tubes secs</li></ul>



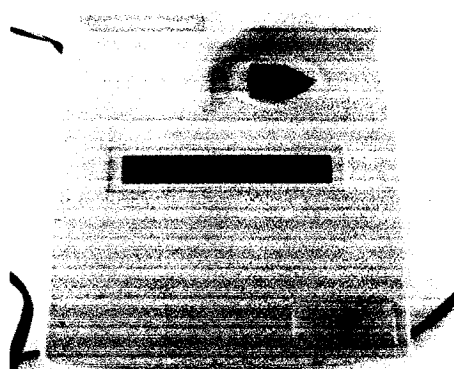
Réfrigérateur (Originale)



Etuve (Originale)



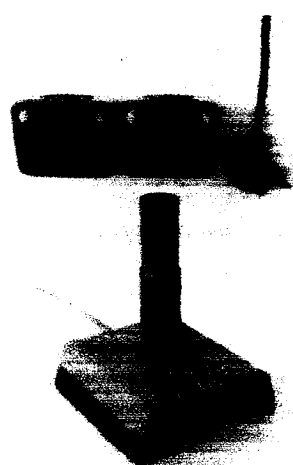
Bain marie (Originale)



Densitomètre (Originale)



Microscope optique(Originale)




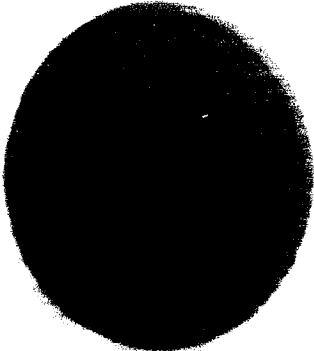
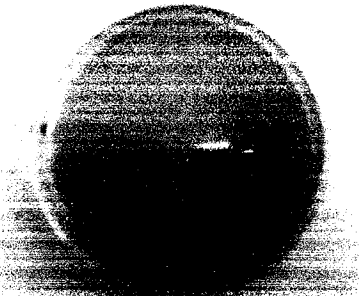
Bec-Bunsn (Originale)

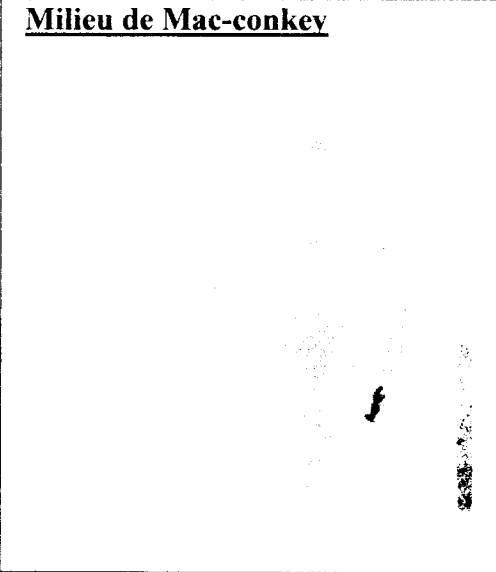
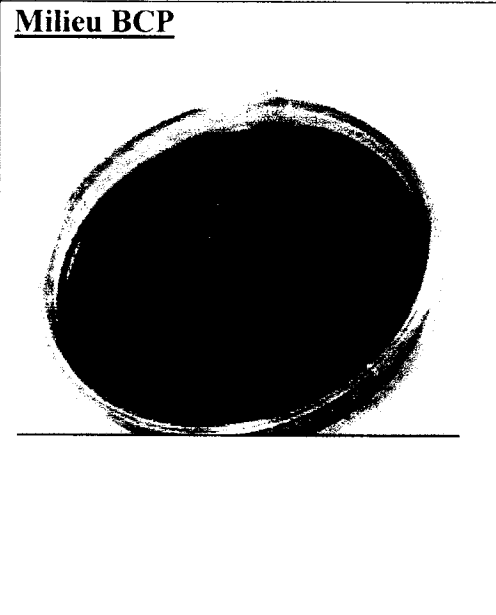
## ANNEXE II: Milieux de cultures, colorants et réactifs

Milieu de culture et d'identification	Solution de coloration	Réactifs d'identification
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gélose nutritive.</li> <li>- Gélose de BCP</li> <li>-Milieu Mac-conkey</li> <li>- Milieu Hektoen</li> <li>- Milieu de Mueller Hinton.</li> <li>- Milieu de conservation.</li> <li>- Bouillon cœur cerveau</li> <li>B.H.I.B.</li> <li>- Bouillon nutritif</li> <li>- Gélose Triple-Sugar-Iron (TSI).</li> <li>- Milieu citrate de Simmons.</li> <li>- Milieu Clark et Lubs.</li> <li>- Milieu urée-indole.</li> <li>- Milieu en ampoules (LDC, ODC, ADH ,Temoin).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Violet de gentiane.</li> <li>- Lugol.</li> <li>- Bleu de méthylène.</li> <li>- Fuschine.</li> <li>- Alcool éthylique à 95°.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réactifs de VP.</li> <li>- Réactifs de Kovacs.</li> <li>- Réactifs pour TDA.</li> <li>- Réactif NR<sub>1</sub> et NR<sub>2</sub>.</li> <li>- Disques d'ONPG</li> <li>- Disque d'oxydase</li> <li>- Eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.</li> </ul>












Les milieux de cultures

Milieu	Composition	Utilisation
<p><u>Gélose nutritive</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrait de viande de bœuf 1g</li> <li>- Extrait de levure..... 2g</li> <li>- Peptone.....5g</li> <li>- Chlorure de sodium.....5g</li> <li>- Agar.....15g</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH = 7,4</b></p>	<p>Milieu d'isolement pour les germes non exigeant</p>
<p><u>Gélose Hektoen</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extrait de levure..... 3g</li> <li>- Protéase peptone.....12g</li> <li>- Lactose.....12g</li> <li>- Saccharose.....2g</li> <li>- Salicine.....2g</li> <li>- Citrate ferrique.....1.5g</li> <li>- Sels biliaires.....9g</li> <li>- Fuchsine acide.....0.1g</li> <li>- Bleu de prom thymol ...0.065g</li> <li>- Chlorure de sodium.....5g</li> <li>- Thiosulfate de sodium.....5g</li> <li>- Agar.....13g</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH= 7.5</b></p>	<p>Isolement des Entérobactéries</p>
<p><u>Gélose Muller Hinton</u></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Infusion de viande de bœuf déshydratée.....300g</li> <li>- Hydrolysate de caséine....17.5g</li> <li>- Amidon de maïs.....1.5g</li> <li>- Agar.....13g</li> <li>- Eau distillée.....1000ml</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH=7,4</b></p>	<p>Milieu pour antibiogramme</p>




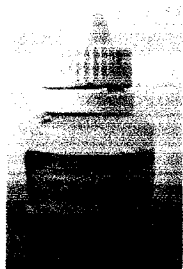
<p><b><u>Milieu de Mac-conkey</u></b></p> 	<p>-Peptone.....20g          -lactose.....10g          -sels biliaries.....1.5g          - cristal violet.....0.001g          - rouge neutre..... 0.05g          - chlorure de sodium..... 5g          - agar.....15g</p> <p><b>PH=7.1</b></p>	<p>Isolements des entérobactéries</p>
<p><b><u>Milieu BCP</u></b></p> 	<p>-peptone .....5g          -extrait de viande .....3g          lactose.....10g          -Agar .....15g          -pourpre de bromocrésol .0.025g</p> <p><b>PH= 7</b></p>	<p>Isolement des entérobactéries</p>



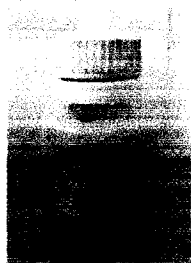
**Les milieux d'identification :**

<b>Milieu</b>	<b>Composition</b>	<b>Utilisation</b>
<b>Urée indole</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tryptophane.....3g</li> <li>• Phosphate monopotassique 1g.</li> <li>• Phosphate bipotassique.....1g.</li> <li>• Chlorure de sodium.....5g.</li> <li>• Urée.....20g.</li> <li>• Rouge de phénol.....0,025g.</li> <li>• Alcool à95°.....0,1ml.</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH=6,7</b></p>	<p style="text-align: center;">La recherche de :</p> <p style="text-align: center;">Uréase TDA Indole</p>
<b>Bouillon Nitrate</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infusion cœur - cervelle...25g</li> <li>• Nitrate de sodium.....10g</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH=7,2</b></p>	<p style="text-align: center;">Recherche de nitrate réductase.</p>
<b>Clark et Lubs</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptone.....5g</li> <li>• Glucose.....5g</li> <li>• Phosphate de potassium.....5g</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH=7.5</b></p>	<p style="text-align: center;">Détermination de la voie fermentaire.</p>
<b>-Citrate de Simmons</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phosphate d'ammonium.... 1g</li> <li>- Phosphate bipotassique..... 1g</li> <li>- Chlorure de sodium..... 5g</li> <li>- Sulfate de magnésium..... 0,2g</li> <li>- Bleu de promothymol....0,08g</li> <li>- Gélose.....15g</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>PH=7,1</b></p>	<p style="text-align: center;">Recherche de citrate.</p>

<p><b>TSI</b></p> 	<p>-Extrait de viande de bœuf...3g          -extrait de levure.....3g          -Peptone.....20g          -chlorure de sodium.....5g          -Glucose.....10g          -lactose.....10g          -saccharose.....1g          -Rouge de phénol.....0,025g          -Citrate ferrique.....3g          -Thiosulfate de sodium.....3g          -Gélose.....12g</p> <p style="text-align: center;"><b>PH=7,5</b></p>	<p>La recherche de la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose)</p>
<p><b>Mannitol mobilité</b></p> 	<p>- Hydrolysate trypsique de caséine.....10g          -Nitrate de potassium.....1g          -          Mannitol.....7,5g          -Rouge de phénol.....40 mg          -Agar.....3,5g</p> <p style="text-align: center;"><b>PH=7,6</b></p>	<p>Dégradation de mannitol et la mobilité des bactéries.</p>
<p><b>ADH</b></p> 	<p>- Extrait de levure.....3g          - L- arginine.....5g          - Glucose.....1g          - Bromocrésol pourpre 0,16mg          - Ethanol solvant de BCP 1cm<sup>3</sup>          - Chlorure de sodium.....5g</p> <p style="text-align: center;"><b>PH = 6.8</b></p>	<p>Recherche d'ADH</p>
<p><b>ODC</b></p> 	<p>- Extrait de levure.....3g          - L- Ornithine.....5g          - Glucose.....1g          - Bromocrésol pourpre 0,16mg          - Ethanol.....1cm<sup>3</sup>          - Chlorure de sodium.....5g</p> <p style="text-align: center;"><b>PH = 6,8</b></p>	<p>Recherche d'ODC</p>
<p><b>LDC</b></p> 	<p>- Extrait de levure.....3g          - L- lysine.....5g          - Glucose.....1g          - Bromocrésol pourpre 0,16mg          - Ethanol.....1cm<sup>3</sup>          - Chlorure de sodium.....5g</p> <p style="text-align: center;"><b>PH =6.8</b></p>	<p>Recherche de LDC</p>

**Les réactifs :**

Réactif	Composition	Utilisation
<b><u>Kovacs</u></b> 	-Diméthyle-amino-4 benzaldéhyde.....50g. -Acide chlorhydrique 250cm <sup>3</sup> . -Pentanol.....750cm <sup>3</sup> .	Recherche d'indole
<b><u>TDA</u></b> 	-Perchlorure de fer....3,4 g. -eau distillé.....100ml.	Recherche de TDA.
<b><u>VPI</u></b> 	- Naph-1-ol.....60g -Ethanol.....1cm <sup>3</sup>	Recherche de l'acétoine.
<b><u>VPII</u></b> 	Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 4mol.cm <sup>3</sup> (10%)	Recherche de l'acétoine.

<p><b><u>NRI</u></b></p> 	<p>-Acide sulfanilique.....8g. -acide éthanique..... 1cm<sup>3</sup></p>	<p>Recherche de nitrate.</p>
<p><b><u>NRII</u></b></p> 	<p>-Alpha-naphtyl-amine...5g -acide éthanique.....1cm<sup>3</sup></p>	<p>Recherche de nitrate.</p>
<p><b><u>RM</u></b></p> 	<p>-Rouge de méthyle.....5g. -Ethanol.....1cm<sup>3</sup>.</p>	<p>Recherche d'RM.</p>

## ANNEXE III : Tableau de la lecture pour la galerie Api 20 E

MICROTUBE	REACTION	
	Positive	Négative
ONPG	Jaune	Incolore
ADH	Rouge ou orange	Jaune
LDC	Rouge ou orange	Jaune
ODC	Rouge ou orange	Jaune
CIT	Bleu	Vert
H <sub>2</sub> S	Dépôt noir	Aucun dépôt
URE	Rouge	Jaune
TDA	Brun – rouge	Jaune
IND	Anneau rouge	Jaune
VP	Rose foncé ou rouge	Incolore
GEL	Diffusion de pigment	Incolore
GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA	Jaune	Bleu

**Table de lecture 1\* : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries***

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8	La réponse à l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline
Amoxicilline +Ac.clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	Les breakpoints des céphalosporines et de l'Aztréonam ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. Ainsi, l'application de ces breakpoints dépend du respect de posologies précises : céfazoline (2g toutes les 8h), céfotaxime (1g toutes les 8h), céftriaxone (1g toutes les 24h)...
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés.
Céfalotine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	A souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. (voir chapitre recherches complémentaires).
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1	
Ceftriaxone	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	Les breakpoints des carbapénèmes ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : Impipénème : 500 mg toutes les 6h ou 1 g toutes les 8h, Ertapénème : 1g toutes les 24h, Méropénème : 1g toutes les 8h. La détection phénotypique d'une carbapénémase par le test MHT est réservée aux études épidémiologiques (voir chapitre recherches complémentaires).
Impipénème/Meropénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	
Ertapénème	10µg	≤ 19	20 - 22	≥ 23	≥ 1	0,5	≤ 0,25	
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	—	≤ 16	La sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est détectée chez les salmonelles isolées d'infections extra-intestinales en testant l'Acide nalidixique à l'antibiogramme.
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1	
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	Ne pas tester en routine sauf pour les salmonelles.
Colistine	—	—	—	—	—	—	—	Ne tester à l'antibiogramme que pour un but diagnostique. (résistance si culture au contact du disque ou présence d'une cocarde).
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32	
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64	Indiqué uniquement pour les souches d'E.coli isolées d'infections urinaires. La CMI est déterminée par la technique de dilution en gélose supplémentée de 25µg/ml de glucose 6-phosphate.
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	—	≤ 2/38	

\* Tableau extrait du Document M100 – S21, Vol. 31, n°1, 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement.

\*\* Extrait des recommandations 2011 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie



AIT OUMGHAR Ouahiba

Biba.aitoumghar@yahoo.com

BEN BRIH Khadidja

benlima634@gmail.com

SALHI Manel

smanell1607@gmail.com

### **Résumé**

*Afin d'étudier les caractéristiques épidémiologiques et de déterminer le mécanisme de résistance des entérobactéries aux carbapénèmes, nous avons réalisé une étude au niveau de laboratoire central de CHU Blida ,unité Frantz Fanon, portant sur l'ensemble des entérobactéries isolées de différents types de prélèvements.*

*L'étude s'est répartie en deux volets ,une étude rétrospective étalée sur une période de trois années, allant de Janvier 2012 à Décembre 2014 et une étude prospective ayant duré 04 mois, de Janvier 2015 à Avril 2015.*

*Notre travail a été réalisé sur 1943 entérobactéries isolées des prélèvements des patients hospitalisés et des patients externes ayant consulté au niveau du CHU Blida.*

*La recherche et l'identification des entérobactéries responsables d'infections s'effectuent par l'examen cyto bactériologique des différents types de prélèvements.*

*L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été faite selon les recommandations du CLSI.*

*La détermination de type de carbapénémase a été réalisé par teste de Hodge modifié et test à l'EDTA.*

*Les résultats obtenus montre un taux d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ERC de 1.28 %.*

*Les ERC sont plus fréquente chez les patients hospitalisés par rapport aux patients externes ; les ERC se trouvent le plus dans les services chirurgicaux, et prédominent au niveau des pus.*

*Les entérobactéries les plus fréquemment rencontrés sont K. pneumoniae et E. cloacae.*

*L'étude de mécanisme de résistance de ces souches visà vis des carbapénèmes montre un taux élevé d'entérobactéries productrices de carbapénémase.*

*Ces souches résistantes représentent une menace réelle, l'usage contrôlé des antibiotiques associés à des mesures d'hygiène peuvent empêcher la sélection et la diffusion de ces souches multirésistantes.*

**Mots clés :** Entérobactéries, carbapénèmes, carbapénémases, Test de Hodge modifié ,Test a l'EDTA.

